



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

돌멍게 (*Pyura vittata*)로부터
항균성 펩타이드의 정제 및 특성



2023년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 수 산 생 명 과 학 부 생 물 공 학 전 공

박 원 정

공 학 석 사 학 위 논 문

돌멍게(*Pyura vittata*)로부터
항균성 펩타이드의 정제 및 특성

지도교수 박 남 규

이 논문을 공학 석사 학위논문으로 제출함.

2023년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 수 산 생 명 과 학 부 생 물 공 학 전 공

박 원 정

박원정의 공학석사 학위논문을 인준함.

2023년 02월 17일



위 원 장 이학박사

이형호



위 원 이학박사

한상준



위 원 이학박사

박남규



목 차

표 목차	v
그림 목차	vi
Abstract	x
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	11
1. 재료	11
1.1. 실험동물	11
1.2. 시약 및 재료	11
2. 방법	12
2.1. 추출	12
2.1.1 추출물의 조제	12
2.1.2 추출물의 Solid Phase Extraction	12
2.2. 항균활성 측정	13
2.2.1. 사용한 균주	13
2.2.2. 배지의 제조	14
2.2.3. 항균활성 측정	15
2.3. Trypsin 처리	15
2.3.1 단백질성 항균물질 측정	15
2.3.2 Trypsin digestion	16

2.4. 항산화 활성	17
2.5. 분리 및 정제	17
2.5.1. Fraction 4로부터 PvAMP1의 정제 과정	19
2.5.2 Fraction 5로부터 PvAMP2와 PvAMP3의 정제 과정	19
2.5.3 Fraction 7로부터 PvAMP4의 정제 과정	20
2.5.4 Fraction 8로부터 PvAMP5~8의 정제 과정	21
2.6 분자량 분석	22
2.7 아미노산 서열 및 Homology 분석	23
2.8 PvAMP4의 cDNA cloning	23
2.8.1 PvAMP4의 3' RACE PCR	24
2.8.2 PvAMP4의 5' RACE PCR	24
2.8.3 PvAMP4의 ORF 분석	25
2.8.4 3D modeling	26
III. 결과	30
1. 추출물의 항균활성	30
2. Trypsin 처리 전후 항균 활성 변화	37
3. 추출물의 항산화 활성	40
4. 추출물 (RM60)로부터 항균활성 물질 정제	42
4.1 Fraction 4로부터 PvAMP1의 정제	42
4.2 Fraction 5로부터 PvAMP2와 PvAMP3의 정제	43

4.3 Fraction 7로부터 PvAMP4의 정제	44
4.4 Fraction 8로부터 PvAMP5~8의 정제	44
5. 정제한 펩타이드의 특성 분석	69
5.1 PvAMP1와 PvAMP2	69
5.1.1 분자량 및 아미노산 서열 분석	69
5.2 PvAMP3	69
5.2.1 분자량 및 아미노산 서열 분석	69
5.2.2 Homology 분석	70
5.3 PvAMP4	70
5.3.1 분자량 및 아미노산 서열 분석	70
5.3.2 Homology 분석	70
5.4 PvAMP5	71
5.4.1 분자량 및 아미노산 서열 분석	71
5.4.2 Homology 분석	71
5.5 PvAMP6~8	72
5.5.1 분자량 및 아미노산 서열 분석	72
5.5.2 Homology 분석	72
6. PvAMP4의 서열 및 특징 분석	85
6.1 서열 분석	85
6.2 Identity	85
6.3 3D modeling	86
IV. 고찰	90

V. 참고문헌	98
논문 요약	113
감사의 말	114



표 목차

Table 1. Fragment and full sequences of ribosomal protein acting as AMP purified from several organisms.	8
Table 2. Types and sizes of AMPs purified from several marine organisms.	9
Table 3. Summary of purified AMP from tunicates.	10
Table 4. List of primer used for cDNA cloning.	29
Table 5. Antimicrobial activity of crude sample and 1st extracts from Sep-Pak C18 cartridge against <i>B. subtilis</i> KCTC1021 and <i>E. coli</i> D31.	35
Table 6. Antimicrobial activity of RM10, RM60, RM100 against 12 strains and 1 type of fungus.	36
Table 7. Change in antimicrobial activity of non treated (NT) and trypsin treated (T) fractions from Sep-Pak C18 cartridge (RM10, RM60, RM100) against <i>B. subtilis</i> KCTC1021, <i>E. coli</i> D31 and <i>C. albicans</i> KCTC 7965.	39
Table 8. Result and further works of PvAMP1~8 from <i>Pyura vittata</i>	97

그림 목차

Figure 1. Timeline showing the emergence of new classes of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria with a 10-year cycle.	6
Figure 2. The mechanism of action of AMP.	7
Figure 3. A summary of the process of extraction and partial purification from sea squirt's whole body.	27
Figure 4. Purification steps of RM60 extracted from sea squirt's whole body.	28
Figure 5. Antioxidant activity of extract.	41
Figure 6. The 1st reversed-phase HPLC chromatogram of the extract of <i>P. vittata</i>	46
Figure 7. The 2nd cation-exchange HPLC chromatogram of active fraction pooled from the previous step.	47
Figure 8. The 3rd reversed-phase HPLC chromatogram of 'F4' in fig. 7.	48
Figure 9. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of the active fraction in fig. 8.	49
Figure 10. The final purification step of PvAMP1 from the active peak in fig. 9.	50
Figure 11. The 3rd reversed-phase HPLC chromatogram of 'F5' in fig. 7.	51
Figure 12. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of the	

fraction A in fig. 11.	52
Figure 13. The 5th reversed-phase HPLC chromatogram of the active fraction in fig. 12.	53
Figure 14. The final purification step of PvAMP2 from the active peak in fig. 13.	54
Figure 15. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of the fraction B in fig. 11.	55
Figure 16. The final purification step of PvAMP3 from the active peak in fig. 15.	56
Figure 17. The 3rd reversed-phase HPLC chromatogram of 'F7' in fig. 7.	57
Figure 18. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of the active fraction in fig. 17.	58
Figure 19. The 5th reversed-phase HPLC chromatogram of active fraction in fig. 18.	59
Figure 20. The final purification step of PvAMP4 from the active peak in fig. 19.	60
Figure 21. The 3rd reversed-phase HPLC chromatogram of 'F8' in fig. 7.	61
Figure 22. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of active fraction in fig. 21.	62
Figure 23. The final purification step of PvAMP5 from the active peak in fig. 22.	63

Figure 24. The 5th reversed-phase HPLC chromatogram of fraction D in fig. 22.	64
Figure 25. The 6th reversed-phase HPLC chromatogram of fraction E in fig. 24.	65
Figure 26. The 7th reversed-phase HPLC chromatogram of active fraction in fig. 25.	66
Figure 27. The final purification step of PvAMP6 and PvAMP7 from the active peak in fig. 26.	67
Figure 28. The final purification step of PvAMP8 from the active peak in fig. 24.	68
Figure 29. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP1 in fig. 10.	73
Figure 30. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP2 in fig. 14.	74
Figure 31. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP3 in fig. 16.	75
Figure 32. Isolation of trypsin-treated sample peaks through comparison of HPLC chromatograms of PvAMP3 absent (A) and present (B) trypsin-treated samples.	76
Figure 33. Determination of molecular weight and N-terminal sequencing of peak 1.	77
Figure 34. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of peak 2.	78

Figure 35. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP4 in fig. 20.	79
Figure 36. Homology analysis of the analyzed amino acid sequence of PvAMP4 with other sea squirt and fish species.	80
Figure 37. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP5 in fig. 23.	81
Figure 38. Homology analysis of the analyzed amino acid sequence of PvAMP5 with sea urchin.	82
Figure 39. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP6~8 in fig. 27 and 28.	83
Figure 40. Homology analysis of the analyzed amino acid sequence of PvAMP6~8 with sea urchin.	84
Figure 41. The full nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of PvAMP4's isomer determined by cDNA cloning.	87
Figure 42. Alignment and molecular weight of full amino acid sequences of PvAMP4's isomer with other sea squirts.	88
Figure 43. 3D modeling of PvAMP4's isomer compared to european rabbit's 40S RPS30.	89

Purification and characterization of antimicrobial peptides from *Pyura vittata*.

Won jeong Park

Department of Marine and Fisheries Life Sciences, Major in Biotechnology

The Graduate School, Pukyong National University

Abstract

This paper investigates and describes the antibacterial and antioxidant activities of *Pyura vittata*'s whole body extract and its biochemical properties. The antibacterial activity assay showed that the extract exhibited antimicrobial activity against a wide range of microbial strains including gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, fish pathogens, and a fungus. The antibacterial activity of the extract was affected by proteolytic enzyme (trypsin) treatment. This result alludes that the extract's antibacterial activity is due to proteinaceous materials contained in the extract. The antioxidant activity of the extract, which is calculated compared to the antioxidant activity of L-ascorbic acid, tend to increase in a concentration-dependent manner. Having confirmed the antimicrobial activity of the whole body extract, series of purification steps were taken using the extract of the sea squirt, during which the antibacterial activity of each fraction was investigated using *Bacillus subtilis* KCTC 1022. The purified antimicrobial peptides (AMPs) were named PvAMPs, which means AMPs isolated from *Pyura vittata*. A total of 8 antimicrobial peptides (PvAMP1-8) were purified. The molecular weights of PvAMP1-3 were analyzed, but the amino acid sequences could not be analyzed. Among them, PvAMP3 was treated with trypsin yielding multiple fragments on reversed phase HPLC, among which was used to obtain a partial amino

acid sequence. Currently, research is underway to find out the complete amino acid sequence of these substances. The amino acid sequence of PvAMP4 was analyzed giving 23 amino acid residues after determining its molecular weight. The revealed amino acid sequence showed high identity with 40S ribosomal protein S30 (RPS30). cDNA cloning was conducted to reveal the entire sequence of PvAMP4, and found the complete sequence of PvAMP isotype, which shows that PvAMP4 precursor protein is consisted of ubiquitin-like protein and ribosomal protein S30. The molecular weight of PvAMP5 was obtained and the amino acid sequence was analyzed. The analyzed sequence comprising 12 amino acids was identical to that of the small regions from the retinol binding protein (RBP) of sea urchin. In addition, the molecular weights and amino acid sequences of PvAMP6-8 were analyzed, and the analyzed sequences had high homology with sea urchin sperm activating peptide (SAP). In this study, for the first time, 8 antimicrobial peptides were purified from sea squirts (*Pyura vittata*) and their properties were analyzed.

I . 서론

1910년에 최초로 화합물인 Salvarsan이 항생제 같은 의학적인 목적으로 사용이 되었다. 이어서 대표적인 항생제인 penicillin이 1928년에 발견되어 1941년 상용화되었다. 이외에도 방선균에서는 aminoglycosides, macrolides 및 ansamycin이 기타 다른 세균에서는 polypeptides, bacitracin 및 polymyxins이 발견되었다. 한편 곰팡이에서는 fusidic acid, cephalosporins 및 enniatins이 합성 항생제에서는 sulfones, quinolones 및 thioamides이 발견되었다. 이러한 변화는 1940년대에서 1960년대까지를 항생제 발견의 황금기로 이끌었다. 발견된 항생제는 의학, 식품 및 농업 등의 다양한 분야에서 사용되면서, 박테리아 및 곰팡이와 관련된 문제들을 해결하였다 [1,2].

하지만 단기간의 과도한 항생제 사용은 Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA)와 Vancomycin Resistant *Enterococcus* (VRE)같은 항생제 저항균의 출현을 야기했다. 내성균에 대항하기 위해 최근 20년 동안 lipopeptide계 항생제, pleuromutilin계 항생제, oxazolidinone계 항생제, lipiarmycin계 항생제 및 diarylquinolines계 항생제 같은 새로운 항생제가 개발되었다. 그러나 동시에 Vancomycin-resistant *Staphylococcus Aureus* (VRSA)같은 새로운 내성균도 함께 등장하였다. 또한 figure 1에 나타냈듯이 1970년대 이후 새로운 항생제 type의 발견은 그 전에 비해서 무척이나 적다 [3]. 따라서 약제 내성 병원체의 지속적인 등장과 새로운 항생제 type의 부족은 이들의 개발과 대체품이 시급하다는 것을 보여주고 있다.

이러한 문제의 해결책으로서 antimicrobial peptide (AMP)가 관심을 받아왔다. AMP는 일반적으로 10 ~ 100개 정도의 아미노산으로 이루어져 있는 짧은 단백질성 물질이다 [5]. AMP는 극도로 보존된 motif를 보유하진 않지만, 항균 활성을 가질 수 있는 몇 가지의 특징들을 보인다 [12]. 첫 번째로 대부분 짧지만 2~9개 정도의 lysine 혹은 arginine과 같은 양전하 아미노산을 포함하고 있어 양이온의 경향을 보인다 [13]. 두 번째로 β -sheet, α -helix, extended 그리고 loop의 2차 구조를 모두 취한다. 그 중 β -sheet와 α -helix 구조를 가장 일반적으로 취하며, 이로 인해 양친매적인 특성을 보인다 [14]. 이런 점들은 AMP가 박테리아, 진균류 및 바이러스 등 넓은 범위의 병원체들과 다양한 방식으로 반응할 수 있게 한다. Figure 2에 나타낸 mechanism인 cell wall targeting, membrane targeting 및 intracellular targeting 등을 통해 병원체를 억제한다 [15].

지금까지 3,100개 이상의 AMP가 식물, 척추동물, 무척추동물, 박테리아와 곰팡이에 이르기까지 다양한 생물들에게서 발견되었다 [6,7, Antimicrobial Peptide Database (<https://aps.unmc.edu/>)]. 예시로 개구리에서 정제된 magainin [4], 곤충에서 정제된 thanatin [27] 및 소에서 정제된 indolicidin [28]등이 있다. 이런 생물들은 스스로를 외부 병원체로부터 보호하기 위해 생체내 면역 반응을 가지고 있다. 이는 특이적 (adaptive) 혹은 비특이적 (innate) 면역반응으로 구분할 수 있다 [8]. 특히 세포성 면역반응과 체액성 면역반응은 선천성 면역반응 중에서 비특이적 면역반응에 해당한다 [9]. AMP는 그 중 체액성 면역반응에 속하며, 생체를 병원체로부터 첫 번째로 방어하는 역할을 한다

[10]. 이는 AMP가 생체 내에서 주요 면역 물질로 작용한다는 것을 보여준다 [11]. 특히 해양생물은 수중 환경에서 광범위한 박테리아와 바이러스 등과 같은 병원체에 지속적으로 노출되어있다. 그 중에서 해양 무척추동물은 기억형 후천 면역이 결여되어 있다고 보고되었다 [29]. 이는 생체 방어를 위해 후천 면역의 결핍을 대체할 효과적인 면역체계를 가지고 있음을 보여주며, AMP가 그 역할을 하는 것으로 예측할 수 있다 [21].

최근 ribosomal protein (RP)도 AMP의 한 종류로서 관심을 받고 있다. RP는 박테리아, 고세균, 진핵생물에 존재하는 세포질 내의 소기관인 리보솜의 단백질 부분이다. RP는 크기에 따라 large subunit (L)과 small subunit (S)으로 구별한다. 최근 논문에 따르면 일부 RP에서 바이러스 및 진균 등에 대해 광범위한 항균 활성을 나타내는 등 여러 추가적인 기능이 보고되고 있다 [42, 43]. 따라서 RP는 효과적인 AMP로 고려될 수 있으며, 몇몇 유기체에서 AMP로 RP를 정제한 사실이 보고된바 있다 (Table 1).

해양 동물이 가지고 있는 AMP는 arenicins, tachyplesins, parasins, 및 pleurocidins 등이 있다 (Table 2). 그 중 멧게는 척색동물문 (*Chordata*), 미색동물아문 (*Urochordata*), 해초강 (*Ascidacea*)에 속하는 부착 생물이다. 척추동물과 무척추동물의 사이에 위치하는 중간적 특성 때문에, 계통학적인 관점에서 동물의 진화학적 기원을 규명하는데 중요한 동물로 알려져 왔다 [22]. 이외에도 위생학, 식품영양학 및 신경 생리학 등 다양한 분야의 연구 생물로 사용되어져 왔다 [23-25]. Table 3에 나타냈듯이, 최근에는 멧게에 존재하는

AMP에 대한 연구에도 관심이 집중되고 있다. *Halocynthia aurantium*에서 정제된 AMP는 dicynthaurin [30]과 halocidin [31]이 있으며, *Halocynthia roretzi*에서는 halocyamine [32]이 정제되었다. 또한 *Halocynthia papillosa*에서는 halocynthin과 papillosin [35]이 발견되었고, *Styela clava*의 경우 clavanins [34], clavaspirin [39] 및 styelins [33]이 발견되었다. 또한 *Styela plicata*로부터는 plicatamide [38]가 정제되었다고 보고되었다. 각 AMP는 멧게의 hemocyte 혹은 pharyngeal에서 정제되었다. 우리나라에서 많이 잡히는 멧게는 남해안에 주로 서식하는 참 멧게 (*H. roretzi*)와 동해안에서 주로 서식하는 비단 멧게 (*H. aurantium*)가 있다 [26]. 멧게는 우리나라나 아시아 국가 혹은 일본 북해도 지방에서 주로 회나 염장 혹은 냉동식품의 형태로 이용된다 [36]. 돌멧게 (*Pyura vitatta*) 또한 우리나라에서 인기가 있는 수산물이다. 돌멧게는 우리나라의 서해와 대한해협, 일본의 전지역, 북미 동부 해안의 온대 및 열대 해역에서 서식을 한다고 알려져 있다. 이외에도 서인도 제도, 북서 아프리카, 북서 태평양에서도 발견된다고 보고되어 있다 [37].

현재까지 이루어진 다른 멧게에 대한 연구와는 대조적으로, 돌멧게에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 특히 멧게의 조직 추출물을 사용하여 AMP를 분리 및 정제한 연구는 전무하다. 본 연구는 현재까지 밝혀진 바가 거의 없는 돌멧게에서 AMP를 정제를 하였다. 따라서 새로운 특성을 보이는 생리활성 물질을 규명하는데 도움을 줄 수 있을 것이라고 생각한다. 결론적으로, 이번 연구에서는 돌멧게의 껍질을 제외한 전 조직을 사용한 추출물에 존재하는 생리활성 물질을 알아보고자

하였으며, 추출물의 항균 및 항산화능을 측정하였다. 최종적으로 돌멩게 조직 추출물로부터 8개의 AMP를 분리 및 정제하였으며, 그 특성을 분석하였다.



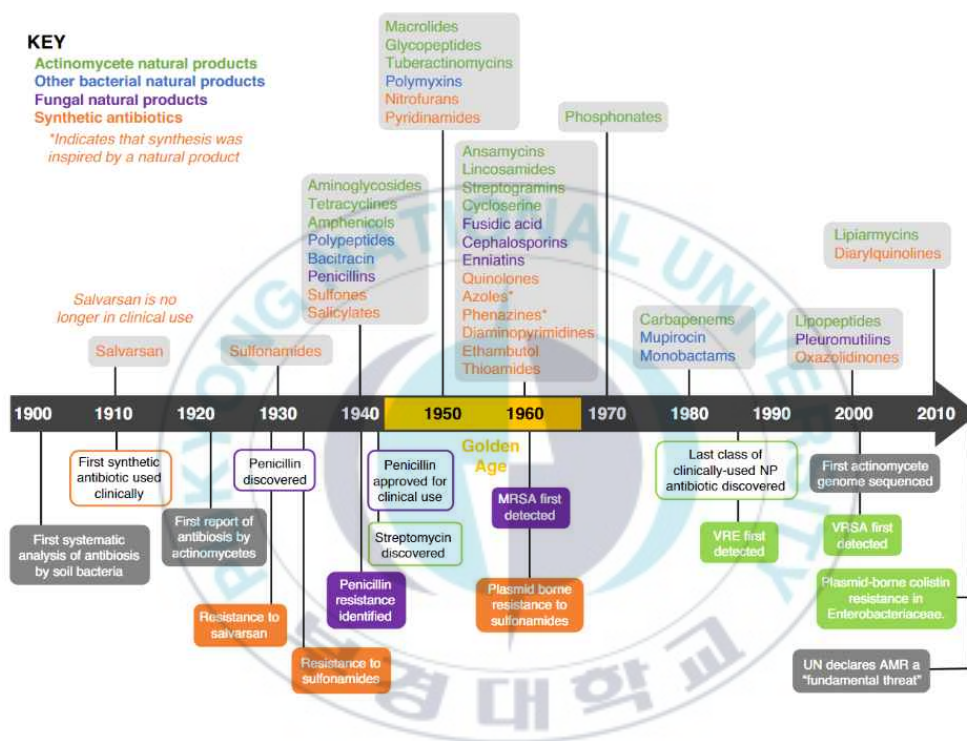


Figure 1. Timeline showing the emergence of new classes of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria with a 10-year cycle [3].

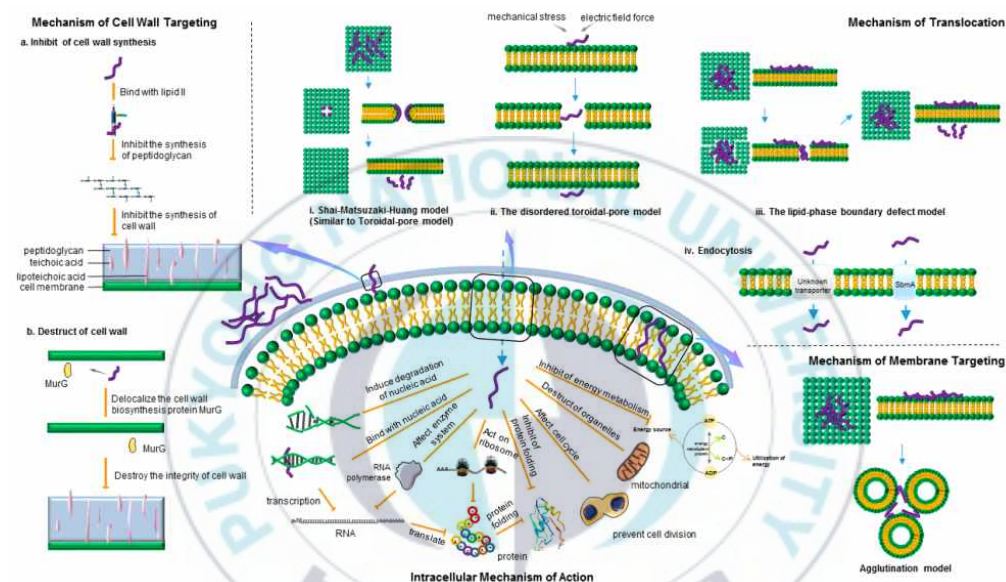


Figure 2. The mechanism of action of AMP. Cell wall targeting mechanisms, translocation mechanisms, membrane targeting mechanisms (only aggregation models are listed) and intracellular mechanisms of intracellular activity are shown. The blue and yellow lines indicate the process, and the short yellow line indicates the inhibitory action [16]

Table 1. Fragment and full sequences of ribosomal protein acting as AMP purified from several organisms.

Type	Sequence	Organism	Reference
RPS15	MADEQAALKKKRTFRKYTYRGVDLDQLDMSSEQLMEMMKARPRRRFSRGLKRKHLALIKKLRKAK KECPALEKPEVVKTHLRNTVIVPEMIGSIVAVYNGKTFNQVEVKPEMIGHYLGEFSITYKPVKHGRPGI GATHSSRFIPLK	<i>Branchiostoma japonicum</i>	[43]
RPS21	GKTVVRSNESLDDALRRFKRSVSKAGTIQEYRKR	<i>Latilactobacillus sakei</i>	[44]
RPS23	MGKPRGLRSARKLKDHRQQRWHDKSFKKAHLGTAVKASPFGGASHAKGIVLEKIGVEAKQPNSAIR KCVRVQLIKNGKKITAFVPNDGCLNYIEENDEVLSVGFGRKGRAVGDI PGVRFKVVKVANVSLALFK EKKERPRS	<i>Branchiostoma belcheri tsingtauense</i>	[45]
RPL1 fragment	FKKLKKLFSKLWNWK	<i>Helicobacter pylori</i>	[46]
RPL27	PALKRKARREAKVKFEERYKTGKNKWFFQKLRF	<i>Silurus asotus</i>	[47]
RPL29	AKSKNHTSHNQNRKQHRNGIHRPKTYRYPSMKGVDPKFLKNLKFSSKHNKNTKK	<i>Crassostrea gigas</i>	[48]
RPL30	MKQKRKTMESINSRLQLVMKSGKYVLGLKETLKVLRQGAKLIIANNTPALRKSEIEYYAmLAKTGV HHYSGNNIELGTACGKYFRVCTLAITDPGSDIIRSM PAEDKGEAK	<i>Branchiostoma belcheri tsingtauense</i>	[49]
RPL36	MKVRPSVKPMCEHCKIIKRKGRVMVICSANPKHKQRQ GK	<i>Pediococcus acidilactici</i> OSU-PECh-3A	[50]

Table 2. Types and sizes of AMPs purified from several marine organisms.

Organism	AMP	Size (aa)	Reference
Invertebrates			
<i>Arenicola marina</i>	Arenicins	21	[51]
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Tachyplesins	17	[52]
<i>Aurelia aurita</i>	Aurelin	40	[53]
<i>Perna viridis</i>	Defensin	45	[54]
<i>Nereis diversicolor</i>	Hedistin	22	[55]
Vertebrates			
<i>Parasilurus asotus</i>	Parasin	19	[56]
<i>Pleuronectes americanus</i>	Pleurocidin	25	[57]
<i>Chrysophrys major</i>	Chrysophsin	20	[58]
<i>Myxine glutinosa</i>	Myxinidin	12	[59]
<i>Nila tilapia</i>	Piscidins	21-44	[60]
<i>Sparus aurata</i>	Hepcidins	26	[61]

Table 3. Summary of purified AMP from tunicates.

Species	AMP	Size (aa)	Reference
<i>Halocynthia aurantium</i>	dicynthaurin	30	[30]
	halocidin	18	[31]
<i>Halocynthia roretzi</i>	halocyamines	4	[32]
<i>Halocynthia papillosa</i>	halocytin	28	[35]
	papillosin	34	[35]
	styelins	33	[33]
<i>Styela clava</i>	clavanins	23	[34]
	clavaspirin	23	[39]
<i>Styela plicata</i>	plicatamide	28	[38]

II. 재료 및 방법

1. 재료

1.1 실험동물

실험에 사용한 돌명게는 민락동 민락어촌계에서 구입하였다. 이후 실험에 이용하기 전까지 13°C의 수조에서 보관하였다. 먼저, 추출물을 얻기 위해 명게를 헤모림프와 껍질과 나머지 조직으로 분리하였다. 헤모림프와 껍질을 제외한 전체 조직은 곧바로 액체 질소에 동결시켰으며, 추출 전까지 -50 °C에 보관하였다.

1.2 시약 및 재료

시료 여과시 사용한 Sep-Pak C18 cartridge는 Waters사 (Miliford, MA, USA)에서, 항균활성 측정실험에 사용한 tryptic soy broth (TSB)는 Millipore사 (Millipore, MA, USA)에서 구입하였다. 배지를 만들 때 사용된 agarose (SeaKem®LE agarose)는 Lonza사 (Lonza, Gampel, Switzerland)의 제품을, 정제 시 사용된 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)용 water와 acetonitrile (CH_3CN , ACN)은 J.T. Baker사 (Avantor, Pennsylvania, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. Trifluoroacetic acid (TFA)는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 이외의 나머지 시약들도 특급을 사용하였다. 항산화 활성 측정의 표준 시약으로 사용한 L-ascorbic acid 와 DPPH 시약 또한 Sigma사로부터

구입하였다. 이 외의 모든 시약들은 특급을 사용하였다.

2. 방법

2.1 추출

2.1.1 추출물 조제

항균활성 물질의 정제를 위해 돌명게 (10 x 7 cm) 4마리의 껍질을 제외한 조직 추출물 (96 g)을 사용하였다. Figure 3에 자세한 추출 과정을 나타내었다. 첫 번째 단계로 조직과 증류수의 비율이 1:4가 될 수 있게 증류수를 넣었다. 그 후, 100 °C에서 5분간 끓인 뒤 얼음을 사용하여 시료를 충분히 냉각하였다. 다음으로 초산 (Acetic acid, AcOH)을 첨가하여 최종적으로 5% 초산이 되게 맞추었다. 두 번째 단계로 냉각시킨 용액을 블렌더와 호모게나이저 (IKA® T10 basic ULTRA-TURRAX, USA)를 사용해 균질화시킨 뒤, 4°C에서 24시간 교반시켰다. 세 번째 단계로 4°C에서 7,000 g로 30분, 10,000 g로 20분 원심분리한 뒤, 상층액만 취해 감압 농축하였다. 최종적으로 120 mL의 추출물을 얻었다.

2.1.2 추출물의 Solid Phase Extraction

추출물 (120 mL)을 HPLC로 정제하기 전, 부분적으로 물질을 분리하기 위해 Sep-Pak C18 cartridge를 사용하였다. 먼저, Sep-Pak C18 cartridge의 activation을 위해 0.1% TFA가 포함된 100%

methanol (MeOH)을 사용하였다. 이후, 0.1 % TFA가 포함된 deionized water (D.W)로 충분히 평형화하였고, 추출물을 주입하였다. 순차적으로 0.1% TFA가 포함된 D.W, 10% MeOH, 60% MeOH 그리고 100% MeOH을 사용해 물질을 용출시켰다. 이를 통해 1차 분획인 D.W, RM (retained materials)10, RM60, RM100과 FT (flow through)를 얻었다. Bradford assay를 통해 FT에 있는 protein의 양을 분석한 결과, FT에 아직 유용한 물질이 남아있다고 판단하였다. 따라서 추가적으로 FT에서 protein을 얻기 위해, 1차 분획 시 얻은 FT를 Sep-Pak C18 cartridge에 주입하였다. 이 과정을 통해 얻은 2차 분획과 기존 1차 분획을 섞은 후 다시 농축하였고, 이를 항균 및 항산화 활성 측정에 사용하였다.

2.2 항균활성 측정

2.2.1 사용한 균주

항균활성 측정을 위해 12종의 균주와 1종의 곰팡이를 사용하였다. 그람 양성균 (gram positive bacteria)으로는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, *Bacillus subtilis* KCTC 1022, *Micrococcus luteus* KCTC 1071 및 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621를 사용하였다. 그 중, 어병세균은 *Lactococcus garvieae* ATCC 49156과 *Streptococcus iniae* FP 5228를 사용하였다. 그람 음성균 (gram negative bacteria)으로는 *Enterobacter cloacae* KCTC 1685, *Escherichia coli* D31, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004,

Salmonella enterica ATCC 13311, *Shigella flexneri* KCTC 2517 및 *Shigella sonnei* ATCC 9290를 사용하였다. 이외에도 곰팡이 균인 *Candida albicans* KCTC 7965도 사용하였다.

2.2.2 배지의 제조

물질의 항균활성을 측정하기 위해 Ultrasensitive Radial Diffusion Assay (URDA)를 수행하였다. 먼저, 실험에 사용할 균을 TSB 배지 3 mL에 접종하고, shaking incubator에서 37°C로 16시간동안 배양하였다. 그 후 배양한 균 100 μ L를 TSB 배지 2 mL에 새로 4시간 계대배양한 뒤, 실험에 사용하였다.

균액의 농도 측정에는 Microplate Reader : Sunrise (TECAN, SWISS)를 사용하였다. Agarose가 들어있지 않은 10 mM phosphate buffer (PB)를 사용하여, 600 nm 파장에서 optical density (O.D. 600)가 0.1이 되도록 희석하여 사용하였다. 사용한 10 mM PB의 조성은 다음과 같다. 10 mM PB : D.W 48.5 mL, TSB powder 0.015 g, 1.0 M Phosphate buffer (PB) (pH 6.57) 1 mL. 추출물의 항균활성을 보기 위해 만든 agarose plate의 underlayer gel 조성은 다음과 같다. Underlayer gel : D.W 48.5 mL, TSB powder 0.015 g, agarose 0.5 g, 1.0 M PB (pH 6.57) 1 mL. 그리고 underlayer gel위에 도포하는 overlayer gel의 조성은 다음과 같다. Overlayer gel : D.W 48.5 mL, TSB powder 3 g, agarose 0.5 g, 1.0 M PB (pH 6.57) 1 mL. 각 용액은 autoclave로 고압 멸균하였으며, 사용하기 전까지 gel의 온도가 42°C가 되도록 항온 수조에

보관하였다. 멸균된 사각 plate에 식힌 underlayer gel 9.5 mL와 희석한 균액 500 μ L를 균일하게 섞어 부어주었다. 이후, 충분히 배지를 굳힌 뒤 실험에 사용하였다.

2.2.3 항균활성 측정

Vacuum pump를 사용하여 underlayer agarose plate에 직경 약 2.5 mm의 well을 만들어, 5 μ L정도의 sample이 들어갈 수 있는 구멍을 만들었다. Well에 주입할 sample은 speed vacuum concentrator를 사용하여 완전히 건조시킨 뒤, 0.01% AcOH에 녹여 사용하였다. 3시간 정도 agarose plate에 완전히 스며들 수 있도록 상온에서 방치하였다. 이후 10 mL의 overlayer gel을 plate에 부은 뒤 굳으면, incubator에서 37°C로 16시간 동안 배양하였다. 활성의 정도는 vernier calipers (Wanlian, China)를 사용하여 well 주위에 생긴 clear zone의 크기를 기준으로 비교하였다.

2.3 Trypsin 처리

2.3.1 단백질성 항균물질 측정

Solid phase extraction을 통해 분리한 RM10, RM60 및 RM100 3가지 분획의 항균 활성이 단백질성 물질에 의한 것인지를 확인해보고자 하였다. 따라서 각 분획에 trypsin을 처리하여, 전과 후의 변화를 URDA로 확인하였다. 각 분획 15 μ g에 sample : trypsin (1 mg/mL)이 3:1이 되도록 trypsin을 처리하고, 37°C에서 1시간

반응시켰다. Speed vacuum concentrator를 사용하여 완전히 건조한 뒤, URDA를 통해 항균 활성을 확인하였다. 활성 측정에 사용한 균주는 *Escherichia coli* D31, *Bacillus subtilis* KCTC 1021와 *Candida albicans* KCTC 7965이다.

2.3.2 Trypsin digestion

N-말단이 blocking되어 있는 sample의 부분적 서열 분석을 위해, trypsin digestion을 수행하였다. 먼저, target protein (0.1~1 mg)에 100 μ L의 6 M Urea in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 첨가하였다. 이후, 200 mM DTT in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 5 μ L 첨가하고, 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 여기에 200 mM Iodoacetamide in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 20 μ L 첨가하였다. 가볍게 vortexing 후 상온에서 어두운 상태로 1시간 반응시켰다. 다음으로 200 mM DTT in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 20 μ L 첨가한 뒤, 상온에서 어두운 상태로 1시간 반응시켰다. 반응시킨 물질에 1 mM CaCl_2 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)을 775 μ L 첨가하였다. 그리고 trypsin solution (0.2 ng/ μ L in 50 mM AcOH)을 1:50 (w/w, trypsin:protein)의 비가 되게 첨가한 뒤, 37°C에서 16시간 반응시켰다. 여기에 formic acid를 첨가해, pH를 3~4로 맞춰주었다.

Trypsin 처리 된 sample만을 얻기 위해서, sample을 첨가하지 않은 negative control과 sample을 첨가한 solution을 각각 HPLC에 injection하였다. C18 column을 사용하여 물질을 분리하였으며, 두 결과를 비교하여 sample이 용출된 peak를 판단하였다. 이를 LC-MS와

PPSQ를 사용하여, 분자량 및 서열 분석을 진행하였다.

2.4 항산화 활성

추출물의 항산화능 (Radical Scavenging Effect, RSE)은 DPPH (1,1 - diphenyl - 2 - picrylhydrazyl)를 사용하여 측정하였다. 10 mM L-ascorbic acid (Final Conc.:100 μ M)를 표준시약으로 사용하였고, 이 때 측정된 항산화 값을 100%로 기준을 잡았다. 먼저, 0.2 mM DPPH (100 μ l)에 MeOH에 녹아 있는 샘플 (100 μ L)과 표준시약 (100 μ L)을 각각 96 well plate에 주입하였다. 이후 sample이 들어있는 plate를 37°C incubator에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후, microplate reader를 사용하여 517 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다. RSE (%)는 아래에 나타낸 식을 사용하여 측정하였다.

$$\text{RSE (\%)} = 100 \times [1 - (\text{optical density of sample} / \text{optical density of control})]$$

2.5 분리 및 정제

RM60 (19.5 mL)으로 부터, 항균활성 펩타이드를 정제하기 위해 HPLC를 사용하였다. 본 연구의 실험에서 분획의 용출은 모두 220 nm 파장으로 확인하였다. 용출된 물질의 항균활성은 URDA 방법을 사용하여 확인하였고, *B. subtilis* KCTC 1022 균주를 대상으로 측정하였다. 최종적으로 PvAMP1~8, 총 8개의 항균 활성 물질을

정제하였다. 정제한 물질은 돌멍게 (*Pyura vittata*)에서 추출된 AMP이므로 편의상 PvAMP로 명명하였다. Figure 4에 전체적인 정제 과정을 나타내었다.

첫 번째 단계로 RM60은 Capcell-Pak C18 reversed-phase column (4.6 X 250 mm, Shiseido, Japan)을 사용해 분리하였으며, 그 조건은 다음과 같다. A 용매로 0.1% TFA를 포함하는 D.W를 사용하였고 B 용매로는 0.1% TFA를 포함하는 ACN을 사용하였다. 농도 구배로는 5→65% ACN, 60 min, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행했다.

명확한 활성을 보인 분획을 모아 두 번째 단계를 진행하였으며, TSK-gel SP-5PW cation-exchange column (7.5 mm X 75 mm, Tosoh, Japan)을 사용하여 다음과 같은 분리 조건으로 수행하였다. A 용매로는 10 mM PB (pH 6.0), B 용매로는 1.0 M NaCl 을 포함하는 10 mM PB (pH 6.0) 를 사용하였다. 농도 구배로는 0 M (60 min), 0 → 1 M NaCl (50 min), 1 M NaCl (50 min), 유속; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였다. 0 M 이후의 분획을 임의로 구획화 했으며, 이를 각각 fraction 1~11로 명명하였다. 각 fraction의 1/10에 해당하는 양을 위와 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하여 분리를 진행하였다. 농도 구배는 10 → 40 % ACN, 60 min, 유속 ; 1.0 mL/min로 설정하여 분리하였다. 모든 peak의 항균 활성을 측정하였으며, 그 중 뚜렷한 활성이 나타난 fraction 4, fraction 5, fraction 7과 fraction 8을 사용해 세 번째 정제과정을 진행하였다. 각 fraction의 1/10을 사용하여 확인한 항균 활성 분획을 모으기 위해,

나머지 9/10도 1/10과 같은 분리 조건으로 세 번째 정제 과정을 진행하였다. 이후 이 fraction은 편의상 F4, F5, F7 및 F8로 명명하였다.

2.5.1 Fraction 4로부터 PvAMP1의 정제 과정

Fraction 4의 9/10을 사용해 모은 활성 분획으로 네 번째 정제를 진행하였으며, 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하였다. 농도 구배로는 16 → 36% ACN, 60min, 유속 ; 1.0 mL/min으로 물질을 분리하였다. 이 중 활성을 나타낸 분획을 모아 최종 정제를 진행하였다. 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하였고, 등용매 용리 (isocratic gradient)로 23% ACN, 유속 ; 1.0 mL/min으로 물질을 분리하였다. 이렇게 얻은 최종 정제 물질을 PvAMP1로 명명하였다.

2.5.2 Fraction 5로부터 PvAMP2와 PvAMP3의 정제 과정

Fraction 5의 9/10에서 항균활성을 보이는 분획을 빠르게 얻기 위해, 농도 구배 조건은 같지만 시간을 줄인 program으로 물질을 분리하였다. 14 → 26% ACN, 24 min, 유속 ; 1.0 mL/min의 농도구배로 분리를 진행하였다. 이 때 얻은 fraction A와 fraction B를 네 번째 정제과정에 사용하였고, 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하였다.

먼저 fraction A는 18 → 38% ACN, 60min, 유속 ; 1.0

mL/min의 농도 구배로 분리를 진행하였다. 이후 활성을 보인 분획을 모아 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하여 다섯 번째 정제를 진행하였으며, 농도 구배로는 19 → 27% ACN, 40min, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였다. 활성을 보인 분획을 사용해 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하여 최종 정제를 진행하였으며, 등용매 용리 22% ACN, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였다. 이 때 얻은 최종 정제 물질을 PvAMP2로 명명하였다.

한편 fraction B는 10 → 40% ACN, 60min, 유속 ; 1.0 mL/min의 농도 구배로 분리를 진행하였다. 이 때 항균활성을 보인 분획을 사용해, 동일한 reversed-phase column과 용매로 다섯 번째 정제를 진행하였다. 농도 구배로는 18 → 30% ACN, 40min, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였다. 여기서 활성을 보인 분획으로 최종 정제를 진행하였다. Column은 X select CSH C18 reversed-phase column (4.6 X 150 mm, Waters, U.S.A)을 사용하였고, 용매는 이전과 같다. 농도 구배로는 18 → 25% ACN, 35min, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였으며, 이 때 얻은 최종 정제 물질을 PvAMP3으로 명명하였다.

2.5.3 Fraction 7로부터 PvAMP4의 정제 과정

1/10의 Fraction7에서 확인한 항균 활성 분획을 모으기 위해, 나머지 9/10의 fraction7도 같은 조건으로 분리를 진행하였다. 모은 분획으로 네 번째 정제를 진행하였으며, 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하였다. 농도 구배로는 13 → 28% ACN,

60min, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였다. 활성을 보인 분획을 모아 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하여 다섯 번째 정제를 진행하였으며, 등용매 용리로 19% ACN, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였다. 활성을 보인 분획은 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하여, 등용매 용리 19% ACN, 유속 ; 0.5 mL/min으로 최종 정제를 진행하였다. 이 때 얻은 최종 정제 물질을 PvAMP4로 명명하였다.

2.5.4 Fraction 8로부터 PvAMP5~8의 정제 과정

Fraction 8의 9/10을 사용해 모은 활성 분획으로 네 번째 정제를 진행하였으며, 동일한 reversed-phase column과 용매를 사용하였다. 농도 구배로는 17 → 22% ACN, 20min, 유속 ; 1.0 mL/min 이후, 등용매 용리 20% ACN, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였다. 활성을 보인 fraction C와 fraction D를 사용하여 동일한 reversed-phase column과 용매로 다섯 번째 정제를 진행하였다.

우선 Fraction C를 사용하여, 추가 정제를 진행하였다. 등용매 용리 20% ACN, 유속 ; 1.0 mL/min으로 분리를 진행하였고, 이 때 얻은 최종 정제 물질을 PvAMP5로 명명하였다.

이어서 fraction D를 사용해, 등용매 용리 20% ACN, 유속 ; 1.0 mL/min 조건으로 분리를 진행하였다. 활성을 보인 fraction E와 fraction F를 사용하여, 동일한 reversed-phase column과 용매로 여섯 번째 정제를 진행하였다.

먼저 fraction E를 추가로 정제하였으며, 등용매 용리 19% ACN, 유속 ; 0.5 mL/min으로 분리를 진행하였다. 활성을 보인 분획을 모아 동일한 reversed-phase column, 용매와 분리 조건으로 일곱 번째 정제를 진행하였다. 이후, 최종 정제를 위해, ACQuity UPLC BEH C18 reversed-phase column (2.1 mm x 100 mm, 300 Å, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용해 분리하였다. 분리 조건으로는 A 용매로 0.1% formic acid를 포함하는 D.W를 사용하였고, B 용매로는 0.1% formic acid를 포함하는 ACN을 사용하였다. 농도 구배로는 10 → 20% ACN, 30min, 유속 ; 0.3 mL/min로 분리를 진행하였다. 이 때 얻은 최종 정제 물질을 각각 PvAMP6과 PvAMP7로 명명하였다.

또한, fraction D에서 분리 된 fraction F의 최종 정제를 진행하였다. 등용매 용리 조건인 20% ACN, 유속 ; 1.0 mL/min으로 물질을 정제하였으며, 이 때 얻은 최종 정제 물질을 PvAMP8로 명명하였다.

2.6 분자량 분석

정제한 항균 물질의 분자량은 부경대학교 공동실험실습관에 있는 Ultra High Resolution Quadrupole Time-Of-Flight (Q-TOF) liquid chromatography mass/mass (LC-MS/MS) spectrometer (maXis; Bruker Daltonics, Bremen, Germany)를 사용하여 측정하였다. 분석에 사용한 column은 Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm x 100 mm, 300 Å, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, USA)이다. 분자량은 electro spray ionization (ESI) source

type으로 측정하였다.

2.7 아미노산 서열 및 Homology 분석

정제한 항균 물질의 아미노산 서열은 부경대학교 공동 실험실습관에 있는 아미노산 sequential analyzer (PPSQ - 31A/33A, Shimadzu, Japan)를 사용하여 edman degradation 방법으로 분석을 진행하였다. 얻은 아미노산 서열은 NCBI blast search를 통해 여러 생물과 homology 분석을 진행하였다.

2.8 PvAMP4의 cDNA cloning

Open reading frame (ORF)의 서열 분석을 위해 cDNA cloning을 진행하였다. 돌멩게 추출물의 total RNA 추출을 위해 Hybrid-R kit (Geneall, Seoul, Korea)를 사용하였다. 이후 rapid amplification of cDNA ends (RACE)용 cDNA를 합성하기 위해, GeneRacer kit (Invitrogen, CA, USA)와 total RNA를 사용하였다. 모든 실험 과정은 protocol대로 진행하였다.

3' RACE용 degenerate primer는 NCBI blast search를 통해 얻은 여러 종의 아미노산 서열을 alignment하여 제작하였다. 5' RACE용 degenerate primer는 3' RACE를 통해 얻은 뉴클레오타이드 서열을 기반으로 제작하였다. ORF 분석용 primer는 3' 과 5' RACE를 통해 분석된 뉴클레오타이드 서열을 기반으로 제작하였다. Table 4에 제작한 primer의 정보를 나타내었다. RACE에는 nTaq-HOT

polymerase (Enzynomics, Daejeon, Korea)와 pGEM-T easy vector (Promega, WI, USA)를 사용하였다. ORF 분석에는 nPfu-Forte (Enzynomics, Daejeon, Korea)와 pTOP Blunt V2 vector (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하였다. 분석된 뉴클레오타이드 서열은 Expasy translate tool을 통해 아미노산 서열로 번역하였다.

2.8.1 PvAMP4의 3' RACE PCR

3' RACE용 primer는 Ubi_DeF1과 GeneRacer 3' primer를 사용하였다. 1' PCR 조건은 다음과 같다: Initial denaturation (95°C, 10 min), [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (51.5°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 5 cycles, [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (53°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 5 cycles, [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (54.5°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 25 cycles, Final Elongation (72°C, 5 min). 서열 분석을 위해 1' PCR product를 vector에 삽입하였다. 분석된 뉴클레오타이드 서열을 아미노산 서열로 번역한 뒤, edman degradation을 통해 얻은 PvAMP4의 아미노산 서열과 비교하였다.

2.8.2 PvAMP4의 5' RACE PCR

5' RACE용 1차 primer는 5' RACE_R1과 GeneRacer 5'

primer를 사용하였다. 1차 PCR 조건은 다음과 같다: Initial Denaturation (95°C, 10 min), [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (58°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 5 cycles, [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (59.5°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 5 cycles, [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (61°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 25 cycles, Final Elongation (72°C, 5 min). 2' PCR용 primer는 5' RACE_R3과 GeneRacer 5' nested primer를 사용하였다. 2차 PCR 조건은 다음과 같다: Initial Denaturation (95°C, 10 min), [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (54°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 5 cycles, [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (55.5°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 5 cycles, [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (57°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 25 cycles, Final Elongation (72°C, 5 min). 서열 분석을 위해 2차 PCR product를 vector에 삽입하였다. 분석된 뉴클레오타이드 서열을 아미노산 서열로 번역한 뒤 ORF 분석용 primer 제작에 사용하였다.

2.8.3 PvAMP4의 ORF 분석

ORF 분석용 primer는 RP_F와 RP_R를 사용하였다. PCR 조건은 다음과 같다: Initial Denaturation (95°C, 2 min), [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (53°C, 30 sec),

Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 5 cycles, [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (54.5°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 5 cycles, [Denaturation (95°C, 30 sec), Annealing (56°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min 30 sec)] x 25 cycles, Final Elongation (72°C, 5 min). 서열 분석을 위해 1차 PCR product를 vector에 삽입하였다. 분석된 뉴클레오타이드 서열을 아미노산 서열로 번역한 뒤, 다른 종과 homology를 분석하였다.

2.8.4 3D modeling

전체 아미노산 서열이 분석된 PvAMP4 isomer의 3D modeling을 위해 SWISS-MODEL sever (<https://swissmodel.expasy.org/>)를 사용하였다. Template로 oryctolagus cuniculus (european rabbit) 40S HCV-IRES (Hepatitis C Virus Internal Ribosomal Entry Site) complex의 40S ribosomal protein S30을 사용하였다.

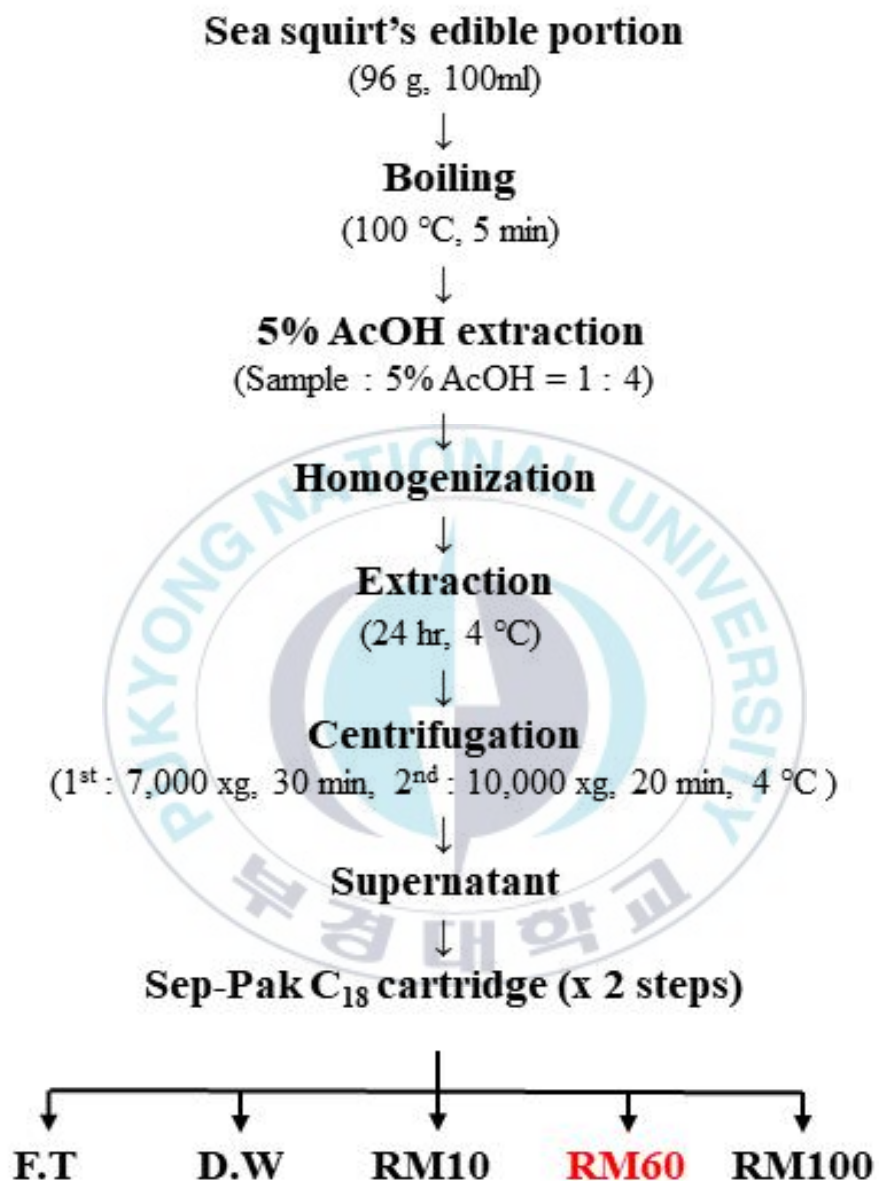


Figure 3. A summary of the process of extraction and partial purification from sea squirt's whole body.

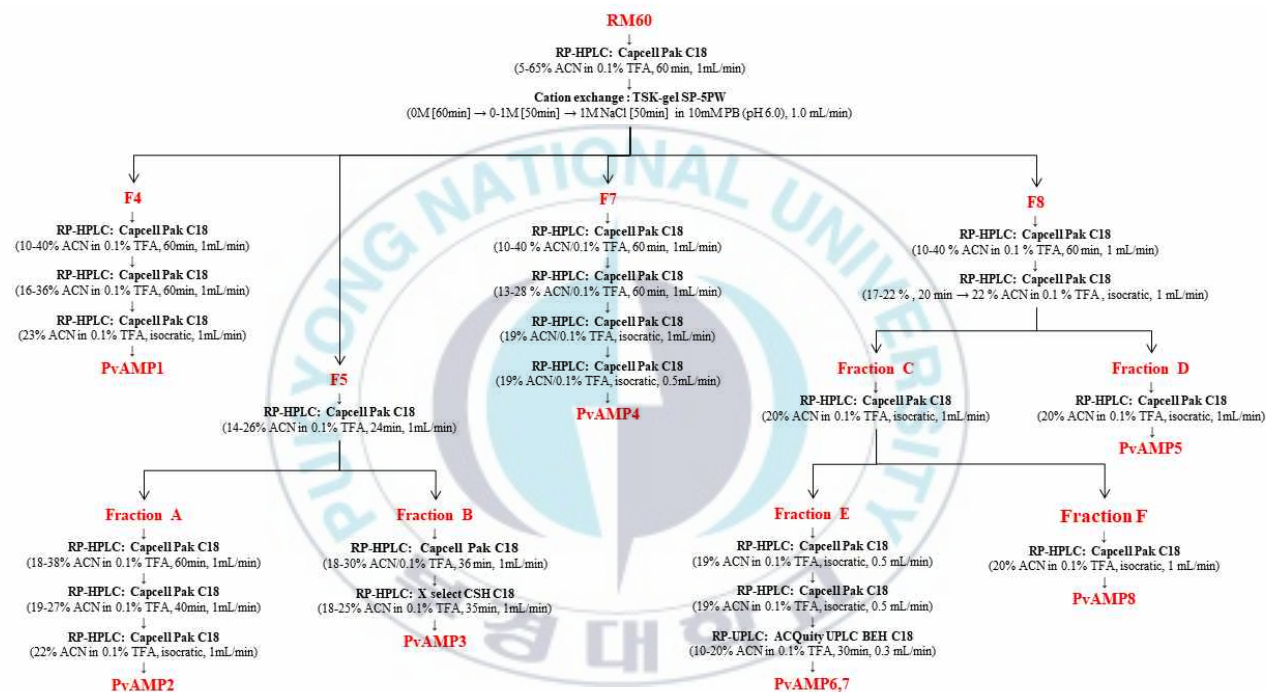


Figure 4. Purification steps of RM60 extracted from sea squirt's whole body.

Table 4. List of primer used for cDNA cloning

Name	Sequence (5'→3')	Information
Ubi_DeF1	GWGCTGGWAARGTSAARG	For 3' RACE PCR
GeneRacer 3' primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	
5'_RACE_R1	GTTCGGACCYTTCCTYCT	For 5' RACE PCR
5'_RACE_R2	CTYCTGCCAAAAGTAGGAACG	
5'_RACE_R3	CATTGACAAAGCGACGGT	
GeneRacer 5' primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	
GeneRacer 5' nested primer	GGCACTGACATGGACTGAAGGAGTA	For ORF analysis
RP_F	GATGATGCAGCTCTTCGTAC	
RP_R	GGAATTTGAGTTCGGACC	

Ⅲ. 결과

1. 추출물의 항균활성

각 물질의 항균활성 측정을 위해 URDA 방법을 사용하였다. 실험에는 돌멩게 조직을 열수 추출한 뒤 얻은, crude한 상층액과 이를 Sep-Pak C18 cartridge를 사용해 부분 정제한 물질 (D.W, RM10, RM60 및 RM100)을 사용하였다. 항균활성 측정 시, 음성 대조군 (negative control)으로 D.W를, 양성 대조군 (positive control)으로 Piscidin I (1 mg/mL)을 사용하였다. Clear zone의 크기는 vernier calipers를 사용하여 측정하였다.

먼저 Bradford assay를 하기 전, *B. subtilis* KCTC 1021과 *E.coli* D31에 대한 각 물질의 항균활성을 측정하였다. 실험에 사용한 물질의 양은 다음과 같다. 먼저, Crude 추출물은 농축액 (120 mL)을 기준으로 각 1/100,000, 1/50,000, 1/10,000을 사용하였다. 1차 부분 정제물질은 FT (120 mL)와 각 농축액 (D.W [17 mL], RM10 [12.5 mL], RM60 [9 mL], RM100 [17.5 mL])의 1/2,000에 해당하는 양을 사용하였다. 각 물질은 speed vacuum concentrator로 건조한 뒤, 5 μ L의 D.W에 녹여 항균 활성을 확인하였다.

Crude 추출물 1/100,000 (1.2 μ L)의 clear zone은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 3.83 mm, *E. coli* D31에서 3.37 mm로 측정되었다. 또한 crude 추출물 1/50,000 (2.4 μ L)에서 clear zone은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 4.19 mm, *E. coli* D31에서 4.07

mm로 측정되었다, 이외에도 crude 추출물 1/10,000 (12 μ L)에서 clear zone은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 6.49 mm, *E. coli* D31에서 6.06 mm로 측정되었다, 다음으로 1차 부분 정제 물질의 항균활성을 확인하였다. 먼저 FT (60 μ L)에서는 *B. subtilis* KCTC 1021에서 14.11 mm, *E. coli* D31에서 3.87 mm의 clear zone size가 측정되었으며, D.W (8.5 μ L)의 clear zone size는 *B. subtilis* KCTC 1021에서 9.29 mm, *E. coli* D31에서 3.87 mm로 측정되었다, 한편 RM10 (6.25 μ L)에서는 *B. subtilis* KCTC 1021에서 2.98 mm, *E. coli* D31에서 2.55 mm의 clear zone size를 확인하였으며, RM60 (4.5 μ L)의 clear zone은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 6.88 mm, *E. coli* D31에서 6.07 mm의 크기를 나타내는 것으로 측정되었다, 또한 RM100 (8.75 μ L)의 clear zone size는 *B. subtilis* KCTC 1021에서 6.69 mm, *E. coli* D31에서 7.77 mm로 측정되었다,

Crude 물질의 항균활성을 확인한 후, Bradford assay를 통해 1차 농축액 각각의 단백질량을 분석하였다. 각 농축액의 단백질 농도는 다음과 같으며, 괄호 안에 농축액의 volume을 함께 표시하였다. FT는 0.332 μ g/ μ L (120 mL), D.W는 0.5167 μ g/ μ L (17 mL), RM 10은 0.315 μ g/ μ L (12.5 mL), RM 60은 1.9967 μ g/ μ L (9 mL) 그리고 RM 100은 1.9867 μ g/ μ L (17.5 mL)로 분석되었다. 따라서 1차 추출물의 항균활성 측정에 사용된 단백질량은 FT는 1.658 μ g, D.W는 4.392 μ g, RM 10은 1.969 μ g인 것으로 계산되었다. 또한, RM 60은 8.985 μ g, RM 100은 17.783 μ g인 것으로 계산되었다. 게다가 1차 부분 정제 후 얻은 FT의 단백질 농도가 0.332 μ g/ μ L로 측정된 것을

통해, FT에 아직 유용한 물질이 남아있다고 판단하였다. 따라서 FT에 남아 있는 물질을 얻기 위해, 추가로 Sep-Pak C18 cartridge를 사용해 2차 부분 정제를 수행하였다. 이후 Bradford assay를 다시 진행하여, 1차와 2차가 혼합된 농축액의 단백질량을 분석하였다. 각 농축액의 단백질 농도는 다음과 같으며, 괄호 안에 농축액의 volume을 함께 표시하였다: FT는 $0.332 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (120 mL), D.W는 $0.419 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (25 mL), RM 10은 $0.133 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (14 mL), RM 60은 $0.981 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (7.5 mL) 마지막으로 RM 100은 $1.249 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (7.5 mL)로 나타났다. 1차와 2차가 혼합된 농축액의 양이 1차 농축액의 양보다 약 2배 많았고, 따라서 다시 측정한 농도가 이전에 1차 분획만 측정한 농도보다 낮게 측정되었다. Table 5에 각 sample의 항균 활성 결과를 정리하여 나타내었으며, 1차 분획의 경우 활성 측정에 사용된 단백질량도 함께 나타내었다. 결론적으로 1차와 2차 분획을 혼합한 물질을 최종 물질로 사용하였다. 각 분획의 단백질 $15 \mu\text{g}$ 을 사용하여, 12종의 균주와 1종의 곰팡이에 대해 항균활성을 측정하였다 (Table 6). 단백질량은 Bradford assay를 통해 측정한 단백질 농도를 기반으로 계산하였다. 단백질 $15 \mu\text{g}$ 을 얻기 위해 필요한 각 sample의 양은 다음과 같다: RM10 $112.8 \mu\text{L}$, RM60 $15.3 \mu\text{L}$, RM100 $12 \mu\text{L}$.

먼저 RM 10을 사용하여, 각 균에 대한 항균 활성을 측정하였다. 그람 양성균에 속하는 *B. subtilis* KCTC 1021에서는 6.04 mm , *B. subtilis* KCTC 1022에서는 5.42 mm 의 clear zone size를 측정하였다. 또한 *M. luteus* KCTC 1071은 5.64 mm , *S. aureus* KCTC에서는 6.98 mm 만큼의 clear zone을 보이는 것을 확인하였다.

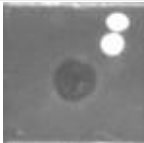
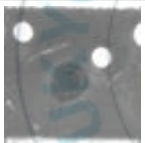
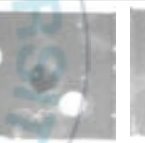
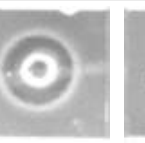
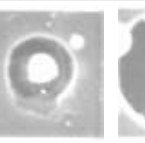
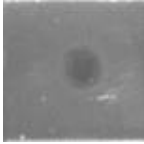
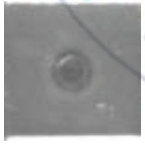
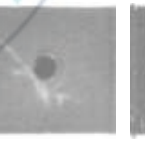
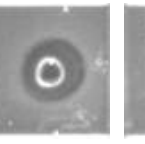
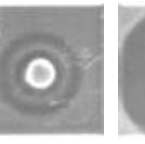
어병 세균인 *L. garvieae* ATCC 49156와 *S. iniae* FP 5228에는 각각 5.68 mm와 4.68 mm의 clear zone의 크기를 측정하였다. 이외에도 그람 음성균 (Gram Negative Bacteria)인 *E. cloacae* KCTC 1685에는 4.47 mm, *E. coli* D31에는 5.18 mm의 clear zone을 나타내는 것을 확인하였다. *P. aeruginosa* KCTC 2004와 *S. enterica* ATCC 13311에는 각각 5.09 mm와 4.82 mm의 clear zone을 확인하였다. 한편 *S. flexineri* KCTC 2517에서는 5.24 mm 그리고 *S. sonnei* ATCC 9290에서는 5.50 mm의 clear zone size를 측정하였다. 곰팡이인 *C. albicans* KCTC 7965에 대해서도 항균 활성을 측정하였으며, clear zone size는 4.14 mm로 확인하였다.

다음으로 RM 60을 사용하여, 항균 활성을 측정하였다. *B. subtilis* KCTC 1021에서는 7.80 mm, *B. subtilis* KCTC 1022에서는 6.49 mm의 clear zone size를 측정하였다. 또한 *M. luteus* KCTC 1071은 5.94 mm, *S. aureus* KCTC에서는 7.61 mm만큼의 clear zone을 보이는 것을 확인하였다. 어병 세균인 *L. garvieae* ATCC 49156와 *S. iniae* FP 5228에는 각각 4.29 mm와 6.74 mm의 clear zone의 크기를 측정하였다. 이외에도 *E. cloacae* KCTC 1685에는 6.71 mm, *E. coli* D31에는 6.87 mm의 clear zone을 나타내는 것을 확인하였다. *P. aeruginosa* KCTC 2004와 *S. enterica* ATCC 13311에는 각각 7.29 mm와 9.10 mm의 clear zone을 확인하였다. 한편 *S. flexineri* KCTC 2517에서는 8.24 mm 그리고 *S. sonnei* ATCC 9290에서는 6.04 mm의 clear zone size를 측정하였다. 곰팡이인 *C. albicans* KCTC 7965에 대해서도 항균 활성을

측정하였으며, clear zone size는 7.51 mm로 확인하였다.

세 번째로 여러 균주에 대한 RM100의 clear zone size를 측정하였다. *B. subtilis* KCTC 1021에서는 6.18 mm, *B. subtilis* KCTC 1022에서는 4.66 mm의 clear zone size를 측정하였다. 또한 *M. luteus* KCTC 1071은 4.13 mm, *S. aureus* KCTC에서는 6.61 mm만큼의 clear zone을 보이는 것을 확인하였다. 어병 세균인 *L. garvieae* ATCC 49156와 *S. iniae* FP 5228에는 각각 3.15 mm와 3.78 mm의 clear zone의 크기를 측정하였다. 이외에도 *E. cloacae* KCTC 1685에는 4.36 mm, *E. coli* D31에는 7.12 mm의 clear zone을 나타내는 것을 확인하였다. *P. aeruginosa* KCTC 2004와 *S. enterica* ATCC 13311에는 각각 3.49 mm와 6.55 mm의 clear zone을 확인하였다. 한편 *S. flexneri* KCTC 2517에서는 6.44 mm 그리고 *S. sonnei* ATCC 9290에서는 3.47 mm의 clear zone size를 측정하였다. 곰팡이인 *C. albicans* KCTC 7965에 대해서도 항균 활성을 측정하였으며, clear zone size는 5.78 mm로 확인하였다. 결론적으로 RM10, RM60, RM100을 사용하여 여러 균주에 대해 항균활성을 측정한 결과, RM60의 항균 활성이 상대적으로 높은 반응을 나타내었다.

Table 5. Antimicrobial activity of crude sample and 1st extracts from Sep-Pak C18 cartridge against *B. subtilis* KCTC1021 and *E. coli* D31.

	Sample									
	Crude 1/100,000	Crude 1/50,000	Crude 1/10,000	FT	D.W	RM 10	RM 60	RM 100	PI (1 mg/mL)	
	Amount of proetin (ng)									
	1.658 4.392 1.969 8.985 17.383									
Microbe	Clear zone (mm)									
<i>B. subtilis</i> KCTC 1021	 3.83	 4.19	 6.49	 14.11	 9.29	 2.98	 6.88	 6.69	 10.00	
<i>E.coli</i> D31	 3.37	 4.07	 6.06	 3.87	 4.38	 2.55	 6.07	 7.77	 12.00	

The amount of protein used for antibacterial activity and the clear zone of piscidin used as a positive control are indicated.

Table 6. Antimicrobial activity of RM10, RM60, RM100 against 12 strains and 1 type of fungus.

Type	Name	Clear zone size (mm)			
		RM10	RM60	RM60	PI
Gram Positive (+)	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	6.04	7.80	6.18	10.47
	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1022	5.42	6.49	4.66	9.44
	<i>Micrococcus luteus</i> KCTC 1071	5.64	5.94	4.13	7.79
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	6.98	7.61	6.61	10.18
	Fish <i>Lactococcus garvieae</i> ATCC 49156	5.68	4.29	3.15	7.22
	pathogen <i>Streptococcus iniae</i> FP 5228	4.68	6.74	3.78	8.15
Gram Negative (-)	<i>Enterobacter cloacae</i> KCTC 1685	4.47	6.71	4.36	7.48
	<i>Escherichia coli</i> D31	5.18	6.87	7.12	10.91
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 2004	5.09	7.29	3.49	7.90
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	4.82	9.10	6.55	8.88
	<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2517	5.24	8.24	6.44	9.87
	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	5.50	6.04	3.47	8.58
Yeast	<i>Candida albicans</i> KCTC 7965	4.14	7.51	5.78	8.45

2. Trypsin 처리 전후 항균 활성 변화

항균 활성을 확인한 분획인 RM10, RM60, RM100이 단백질성 항균 물질인지를 확인하기 위해, 각 분획 (15 μ g)에 trypsin 처리를 하였다. Trypsin 처리 전후의 변화를 보기위해 URDA 방법을 이용하였다. 항균 활성은 *B. subtilis* KCTC 1021, *E. coli* D31와 *C. albicans* KCTC 7965에 대하여 측정하였다. Table 7에 각 분획의 trypsin 전과 후 clear zone 크기를 변화를 나타내었다.

Trypsin 처리 전 각 분획의 clear zone의 크기는 다음과 같다. 먼저 RM10은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 5.77 mm, *E. coli* D31에서 5.18 mm 그리고 *C. albicans* KCTC 7965에서는 4.14 mm로 측정되었다. RM60은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 7.85 mm, *E. coli* D31에서 6.87 mm 그리고 *C. albicans* KCTC 7965에서 7.51 mm의 clear zone의 크기를 확인하였다. 또한 RM100은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 6.51 mm, *E. coli* D31에서 7.12 mm 그리고 *C. albicans* KCTC 7965에서는 5.78 mm로 측정되었다.

반면, Trypsin 처리 후 각 분획의 clear zone의 크기는 다음과 같다. RM10은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 5.56 mm, *E. coli* D31에서 4.77 mm 그리고 *C. albicans* KCTC 7965에서는 4.04 mm로 측정되었다. RM60은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 8.64 mm, *E. coli* D31에서 6.60 mm 그리고 *C. albicans* KCTC 7965에서 8.08 mm의 clear zone의 크기를 확인하였다. 또한 RM100은 *B. subtilis* KCTC 1021에서 6.81 mm, *E. coli* D31에서 4.55 mm

그리고 *C. albicans* KCTC 7965에서는 6.03 mm로 측정되었다.

따라서 Trypsin 처리 전과 후의 항균활성 변화를 비교해보면 다음과 같다. RM10은 trypsin 처리 후 항균활성이 약간 줄어드는 경향을 보였다. 반면 RM60은 trypsin 처리 후, *B. subtilis* KCTC 1021과 *C. albicans* KCTC 7965에서 항균활성이 커지는 경향을 보였다. 하지만 *E. coli* D31에 대해서는 약간 작아지는 것을 확인했다. 동일하게 RM100도 *B. subtilis* KCTC 1021과 *C. albicans* KCTC 7965에서 항균활성이 커지는 경향을 보였다. 그리고 *E. coli* D31에 대해서는 명확히 항균활성이 작아지는 것을 확인하였다.

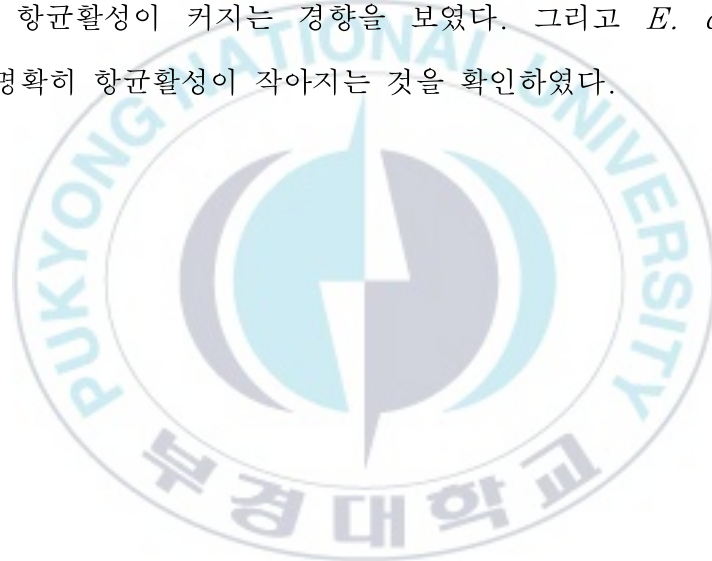
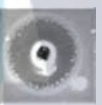
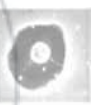
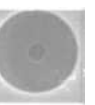
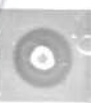
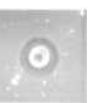
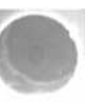
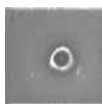
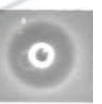
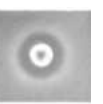
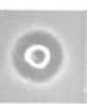


Table 7. Change in antimicrobial activity of non treated (NT) and trypsin treated (T) fractions from Sep-Pak C18 cartridge (RM10, RM60, RM100) against *B. subtilis* KCTC1021, *E. coli* D31 and *C. albicans* KCTC 7965.

	Sample						
	RM 10		RM60		RM 100		PI (1 mg/mL)
	NT	T	NT	T	NT	T	
Microbe	Clear zone (mm)						
<i>B. subtilis</i> KCTC1021	 5.77	 5.56	 7.85	 8.64	 6.51	 6.81	 10.93
<i>E. coli</i> D31	 5.18	 4.77	 6.87	 6.6	 7.12	 4.55	 10.91
<i>C. albicans</i> KCTC7965	 4.14	 4.04	 7.51	 8.08	 5.78	 6.03	 8.45

3. 추출물의 항산화 활성

DPPH를 사용하여 추출물의 RSE를 측정하였다. Positive control로 10 mM의 L-ascorbic acid (Final Conc.:100 μ M)를 사용하였다. 이 값을 100%로 기준을 잡고, 추출물의 항산화 활성을 비교하여 백분율로 나타내었다. 각 샘플을 MeOH에 녹여, 375, 300, 225, 150 및 75 μ g/mL로 희석하여 사용하였다.

추출물은 가장 낮은 농도인 75 μ g/mL에서 26.88%를, 150 μ g/mL의 농도에서는 42.79 %의 항산화 활성을 보였다. 또한 225 μ g/mL의 농도에서는 49.42 %, 300 μ g/mL의 농도에서는 54.09 %의 항산화 활성을 보였다. 그리고 제일 높은 농도인 375 μ g/mL에서는 60.39 %의 항산화 활성을 나타내었다.

위 결과 값을 사용해 ordinary one-way anova 방식으로 Bonferrini's multiple comparisons test를 실시하였다. P value가 0.05 이하인 것만 통계학적으로 유의성이 있다고 나타내었으며, 결과 값들의 차이를 알파벳으로 구분하여 나타내었다 (Fig. 5).

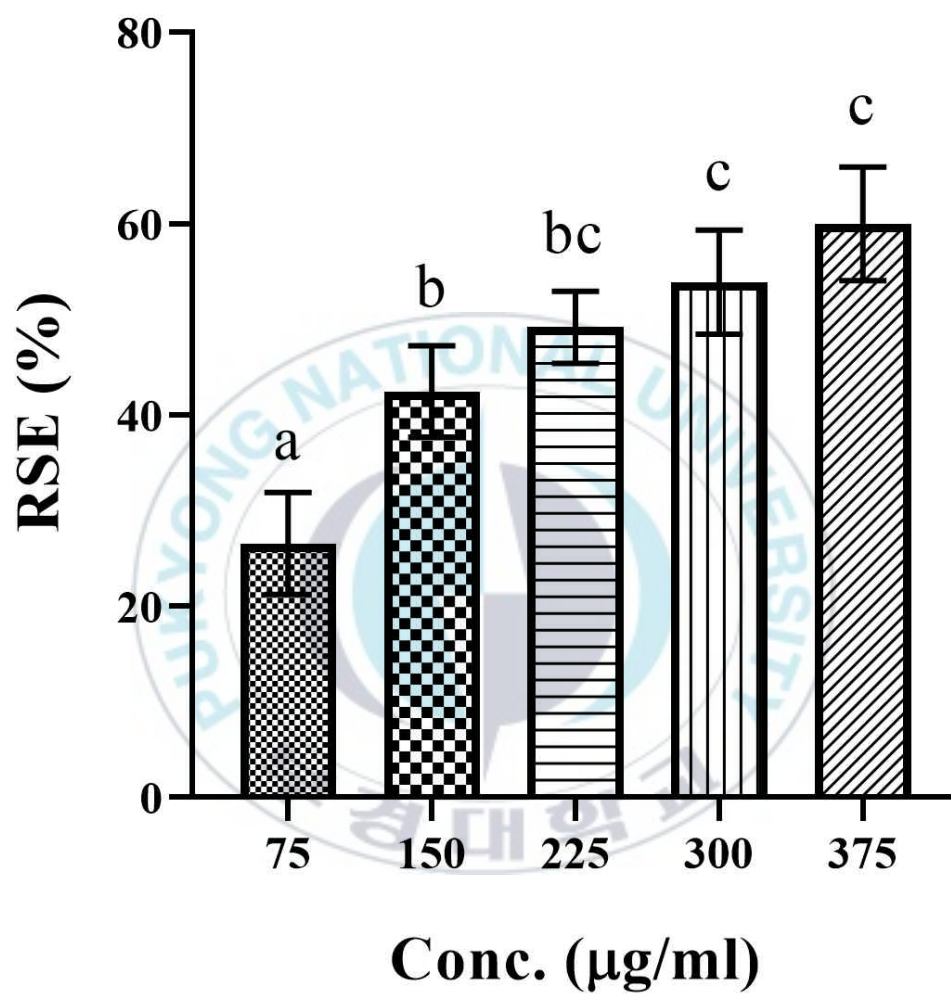


Figure 5. Antioxidant activity of extract. A value using L-ascorbic acid as a sample was used as a positive control, and this value was set as 100% to represent the RSE values of other samples.

4. 추출물 (RM60)로부터 항균활성 물질 정제

항균활성 물질을 정제하기 위해서, 추출물 중 항균 활성이 가장 강한 RM60을 사용하였다. 각 물질의 항균활성은 URDA 방법을 사용해 확인하였으며, 최종적으로 총 8개의 항균활성 물질 (PvAMP1~8)을 정제하였다.

첫 번째 정제 단계에서는 검은 막대로 표시된 ACN 16-37 % (19-40 min)에서 뚜렷한 항균활성을 보였다. 이 분획을 모아 다음 정제 단계를 진행하였다 (Fig. 6).

두 번째 정제 단계에서 용출된 분획을 fraction 1~11로 나누었다. 그 중 항균활성이 뚜렷하게 나타난 fraction 4, fraction 5, fraction 7 및 fraction 8을 사용하여 다음 단계를 진행하였다. [fraction4 (0.36-0.44 M NaCl), fraction5 (0.44-0.56 M NaCl), fraction7 (0.64-0.76 M NaCl), fraction8 (0.76-0.96 M NaCl)] 이들을 편의상 F4, F5, F7 및 F8로 명명하였으며, 해당 구간은 검은 막대로 표시하였다 (Fig. 7).

4.1 Fraction 4로부터 PvAMP1의 정제

먼저 'F4'를 사용하여 세 번째 정제를 진행하였다. 검은 화살표로 표시한 ACN 23.4-23.65% (34.8-35.3 min)에서 항균활성을 확인하였다 (Fig. 8). 이 분획을 모아 네 번째 정제를 진행하였다. ACN 23.17-23.63% (29.5-30.9 min)에서 main peak가 용출되었으며,

이를 검은 화살표로 표시하였다 (Fig. 9), 이 분획을 모아 최종 정제를 진행하였고, 13.0-14.4 min에 얻은 물질을 'PvAMP1'으로 명명하였다 (Fig. 10).

4.2 Fraction 5로부터 PvAMP2와 PvAMP3의 정제

Fig. 7에 나타낸 'F5'를 사용하여 세 번째 정제를 진행하였다. ACN 23.65-24.00% (27.3-28.0 min)와 ACN 24.0-24.3% (28.0-28.6 min)에서 명확한 항균활성을 확인하였다 (Fig. 11). 이 peak를 편의상 fraction A와 fraction B로 명명하였으며, 각각 추가 정제를 진행하였다.

Fraction A를 사용한 네 번째 정제 단계의 분획 중, ACN 23.07-23.23% (23.2-23.7 min)의 분획에서 항균활성을 나타내었다 (Fig. 12). 항균활성을 나타낸 분획을 사용하여 다섯 번째 정제를 진행하였다. ACN 22.52-22.72% (25.6-26.6 min)에서 항균활성이 나타났으며, 해당 분획을 최종 정제에 사용하였다 (Fig. 13). Isocratic 조건에서 12.3-13.5 min에 물질이 용출되었으며, 이 최종 물질을 'PvAMP2'로 명명하였다 (Fig. 14).

Fraction B를 사용한 네 번째 정제 단계의 분획 중, ACN 23.0-23.2% (23.0-23.5 min)의 peak에서 항균활성을 나타내었다 (Fig. 15). 항균활성을 나타낸 peak를 사용하여 다음 정제를 진행하였다. 최종적으로 ACN 20.24-20.36% (18.2-18.8 min)에서 용출된 물질을 'PvAMP3'로 명명하였다 (Fig. 16).

4.3 Fraction 7로부터 PvAMP4의 정제

세 번째로 Fig. 7에 나타난 'F7' 분획을 사용하여 추가 정제를 진행하였다. 검은 막대로 표시한 ACN 18.95-20.15% (25.9-28.3 min)에서 항균활성을 확인하였다 (Fig. 17). 이 분획을 모아 다음 정제를 진행하였다. 네 번째 정제 단계의 분획 중 ACN 19.69-20.38% (34.7-37.5 min)의 peak에서 항균활성을 확인하였으며, 이 구간을 검은 막대로 표시하였다 (Fig. 18), 이 분획을 모아 ACN 19% isocratic 조건에서 다섯 번째 정제를 진행하였다. 분획들 중에서 가장 큰 항균활성을 나타낸 22.0-24.8 min에 용출된 물질을 다음 정제과정에 사용하였다 (Fig. 19). 최종 정제 결과, 28.8-31.4 min에서 single peak를 확인했으며, 이 물질을 'PvAMP4'로 명명하였다 (Fig. 20).

4.4 Fraction 8로부터 PvAMP5~8의 정제

다음으로 Fig. 7에 나타난 'F8' 분획을 사용하여 세 번째 정제를 진행하였다. 검은 화살표로 표시한 ACN 20.25-21.4% (28.5-30.8 min)의 피크에서 명확한 항균활성이 나타났다 (Fig. 21). 이 피크를 사용해서 네 번째 정제 단계를 진행했으며, ACN 20.18-20.63% (20.7-22.5 min)와 ACN 20.63-20.93% (22.5-23.7 min)에서 용출된 분획에서 항균활성을 확인하였다 (Fig. 22). 각 분획을 편의상 순서대로 fraction D와 fraction C로 명명하였으며, 추가 정제를 진행하였다.

먼저, 뒤쪽 분획인 fraction C를 사용하여 최종 정제를

진행하였다. Isocratic 조건에서 13.0-13.9 min에 물질이 용출되었으며, 검은 화살로 표시한 최종 물질을 'PvAMP5'로 명명하였다 (Fig. 23).

다음으로 앞쪽 분획인 fraction D를 사용하여 다섯 번째 정제를 진행하였다. ACN 19% 조건에서 12.4-13.6 min과 14.3-14.9min에 용출된 분획에서 항균활성을 확인하였다 (Fig. 24). 이 분획을 편의상 fraction E와 fraction F로 명명하였으며, 각각 다음 정제를 진행하였다.

Fraction E를 사용하여 여섯 번째 정제 단계를 진행한 결과, 38.7-39.8 min에서 명확한 항균활성을 나타내었다 (Fig. 25). 이 피크를 사용하여 일곱 번째 정제를 진행하였고, 33.4-34.6 min에서 용출된 피크를 마지막 정제에 사용하였다 (Fig. 26). 최종적으로 ACN 14.36-14.42% (14.36-14.42 min)와 ACN 14.46-14.56% (14.7-15.0 min)에서 두개의 피크를 확인하였다 (Fig. 27). 용출된 각 물질을 검은 화살표로 표시하였으며, 각각을 'PvAMP6'과 'PvAMP7'로 명명하였다.

Fraction F의 최종 정제는 isocratic 조건에서 진행하였으며, 13.6-15.2 min에 물질이 용출되었다. 검은 화살표로 표시한 최종 물질을 'PvAMP8'로 명명하였다 (Fig. 28).

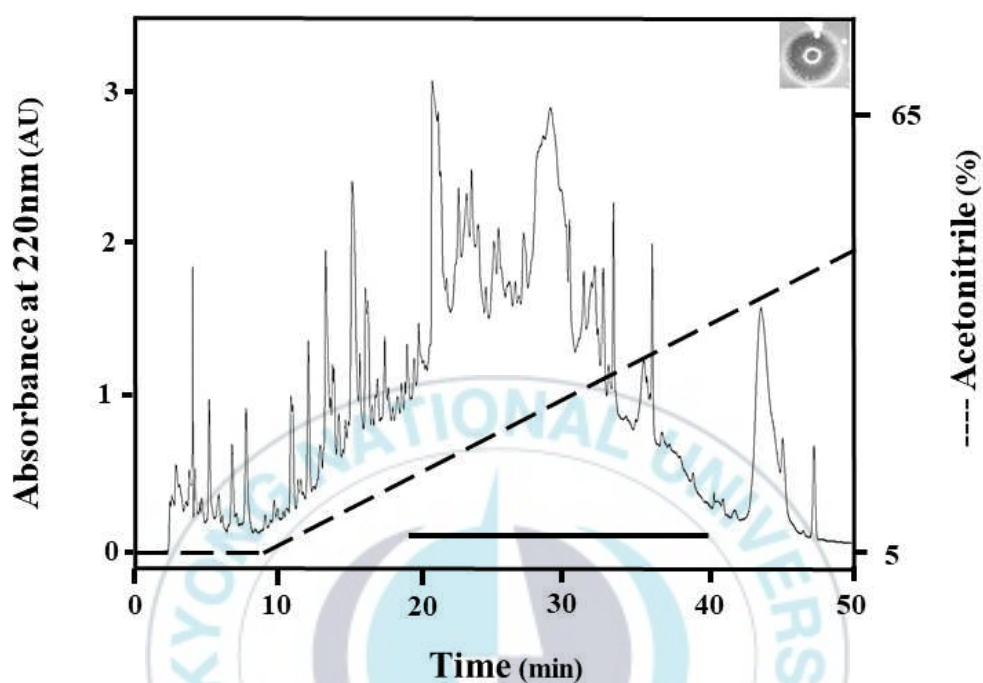


Figure 6. The 1st reversed-phase HPLC chromatogram of the extract of *P. vittata*. Elution was performed with a linear gradient of 5–65 % ACN in 0.1% TFA for 60 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fractions of 16–37 % ACN, which were eluted at 19–40 min, were collected. The eluate was monitored at 220 nm and the black bar indicates the active fractions used for further purification step. The URDA result of the fraction showing the greatest antibacterial activity among the fractions indicated by the black bar in the upper right is shown.

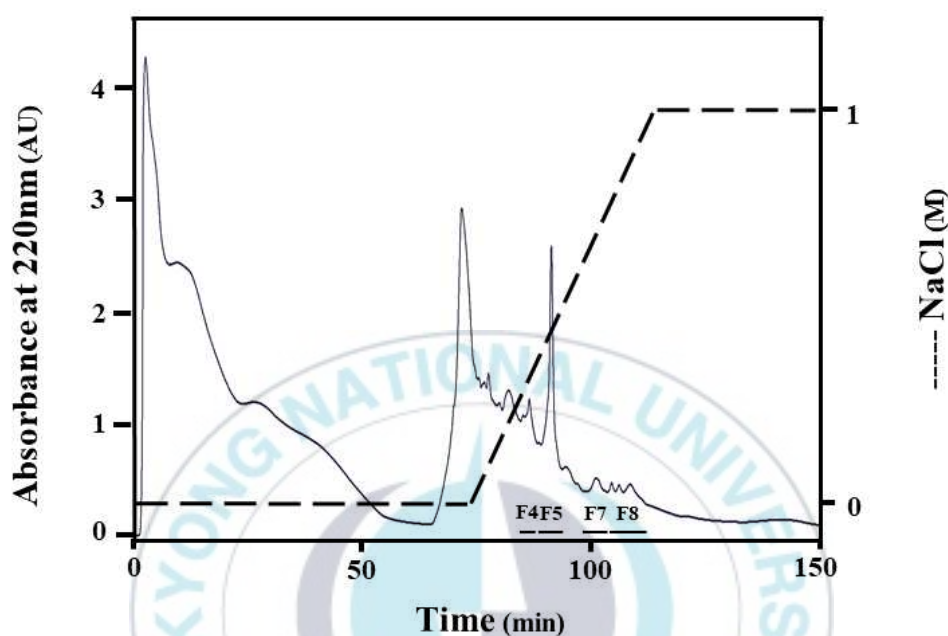


Figure 7. The 2nd cation-exchange HPLC chromatogram of active fraction pooled from the previous step. Elution was programmed 60 min of 0 M stay, 50min of a linear gradient of 0–1 M and 50 min of 1 M NaCl stay using TSK-gel SP-5PW column at a flow rate of 1 mL/min. Fraction marked with the "F4" was eluted at 0.36–0.44 M NaCl (84–88 min). And "F5" was eluted at 0.44–0.56 M NaCl (88–94 min). Then "F7" was eluted at 0.64–0.76 M NaCl (98–104 min). Furthermore "F8" was eluted at 0.76–0.96 M NaCl (104–112 min). The eluate was monitored at 220 nm and the black bars indicate fractions used to next purification step.

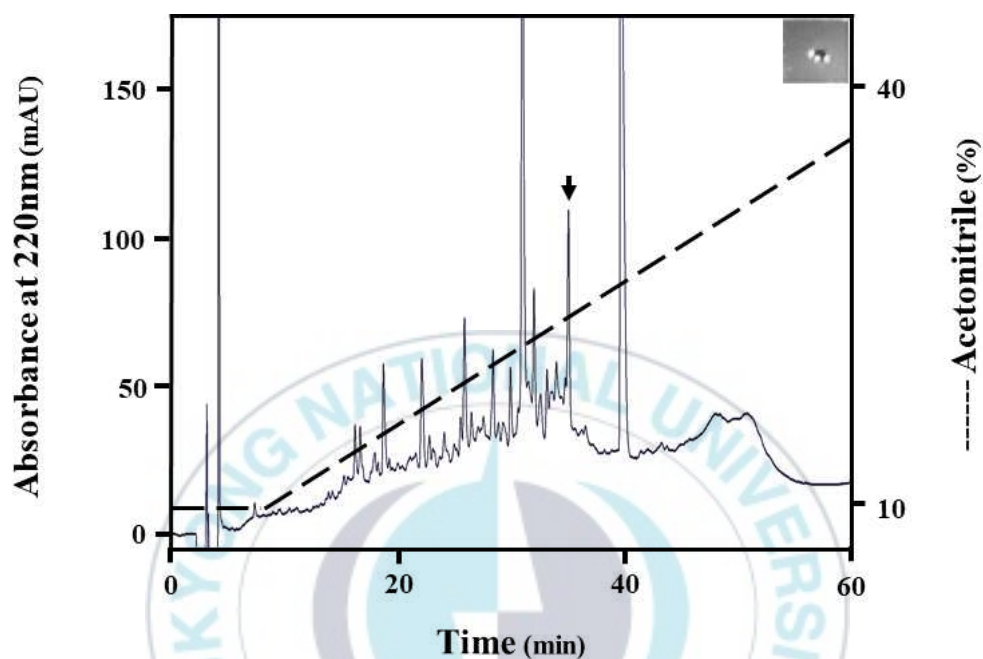


Figure 8. The 3rd reversed-phase HPLC chromatogram of 'F4' in fig. 7. Elution was performed with a linear gradient of 10–40% ACN in 0.1% TFA for 60min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by black arrow) of 23.4–23.65% ACN, which was eluted at 34.8–35.3 min, were used for next purification step. The eluate was monitored at 220 nm. The URDA result of the fraction indicated by the black arrow in the upper right is shown.

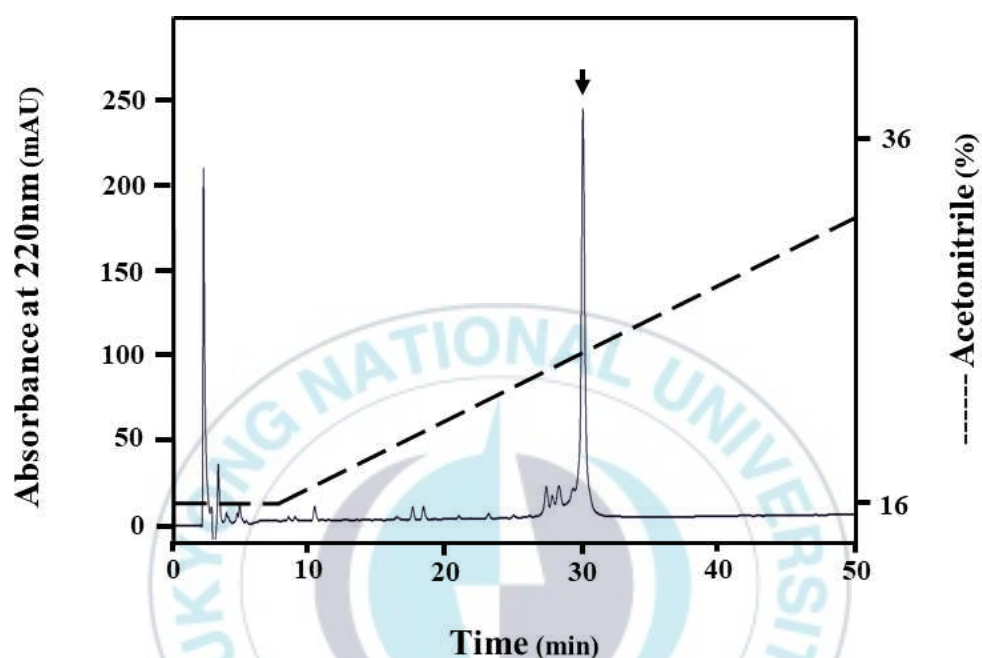


Figure 9. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of the active fraction in fig. 8. Elution was performed with a linear gradient of 16–36% ACN in 0.1% TFA for 60 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by black arrow) of 23.17–23.63% ACN, which was eluted at 29.5–30.9 min, showed antimicrobial activity and was used for final purification step. The eluate was monitored at 220 nm.

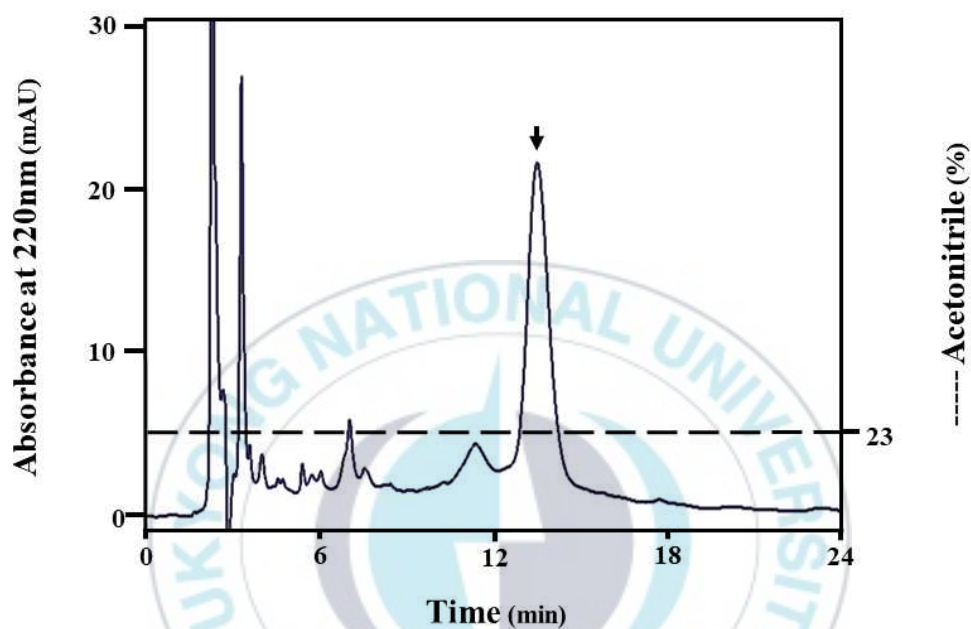


Figure 10. The final purification step of PvAMP1 from the active peak in fig. 9. Elution was performed with isocratic condition of 23% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. The elution was monitored at a wavelength of 220 nm. Fraction (indicated by black arrow) with retention time of 13.0–14.4 min was collected and named PvAMP1. And the molecular weight of the PvAMP1 was analyzed by LC-MS.

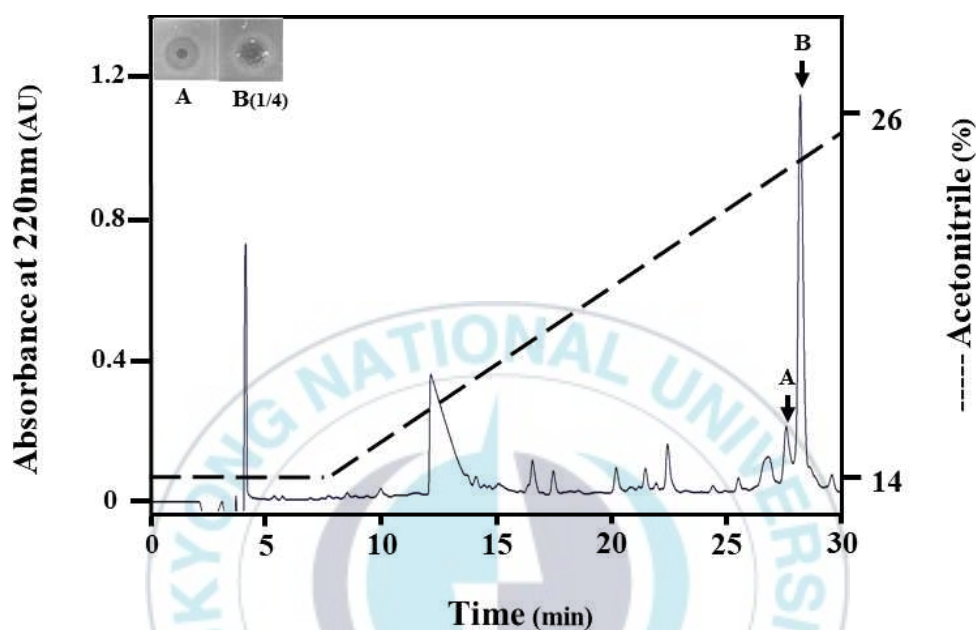


Figure 11. The 3rd reversed-phase HPLC chromatogram of 'F5' in fig. 7. Elution was performed with a linear gradient of 14–26 % ACN in 0.1 % TFA for 24 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction A of 23.65–24.00% ACN, which was eluted at 27.3–28.0 min, was collected. Fraction B of 24.0–24.3% ACN was collected, which was eluted at 28.0–28.6 min. The black arrows indicate the active fractions used for next purification step and the eluate was monitored at 220 nm. URDA results for each fraction indicated by a black arrow in the upper left are shown.

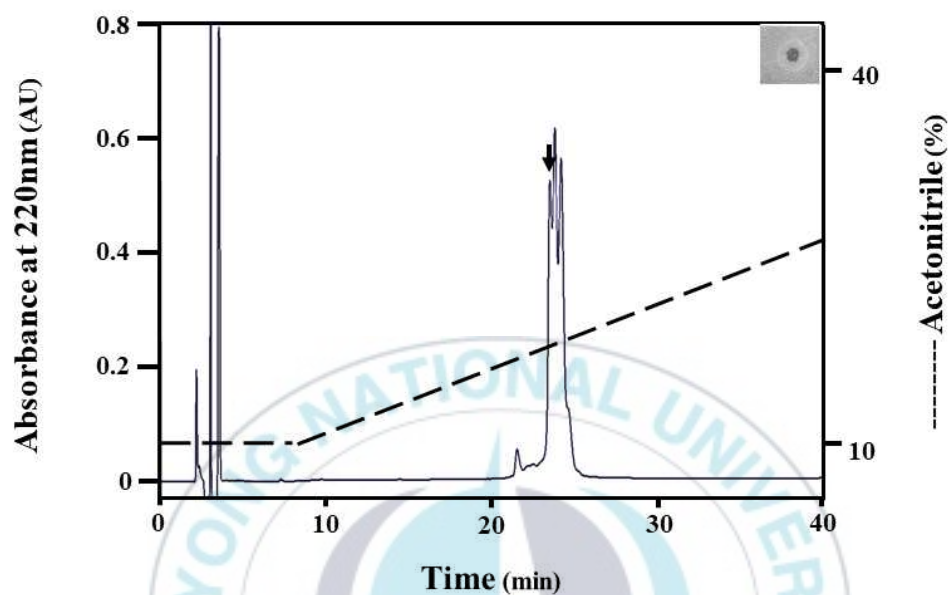


Figure 12. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of the fraction A in fig. 11. Elution was performed with a linear gradient of 18–38% ACN in 0.1 % TFA for 60 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by black arrow) of 23.07–23.23% ACN with retention time of 23.2–23.7 min, showed antimicrobial activity and was used for next purification step. The eluate was monitored at 220 nm. URDA results for each fraction indicated by a black arrow in the upper right are shown.

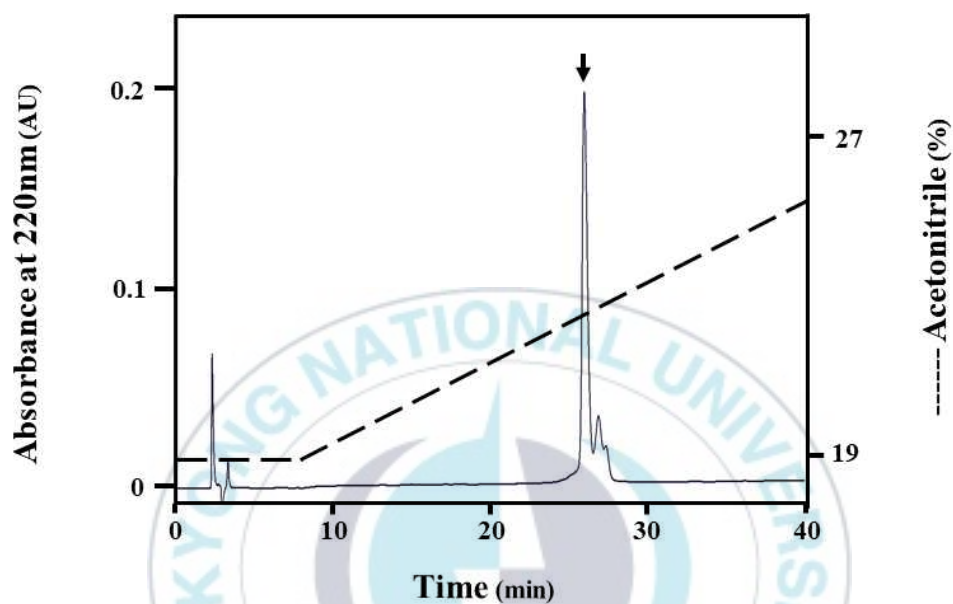


Figure 13. The 5th reversed-phase HPLC chromatogram of the active fraction in fig. 12. Elution was performed with a linear gradient of 19–27% ACN in 0.1% TFA for 40 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by black arrow) of 22.52–22.72% ACN, which was eluted at 25.6–26.6 min, showed antimicrobial activity and was used for final purification step. The eluate was monitored at 220 nm.

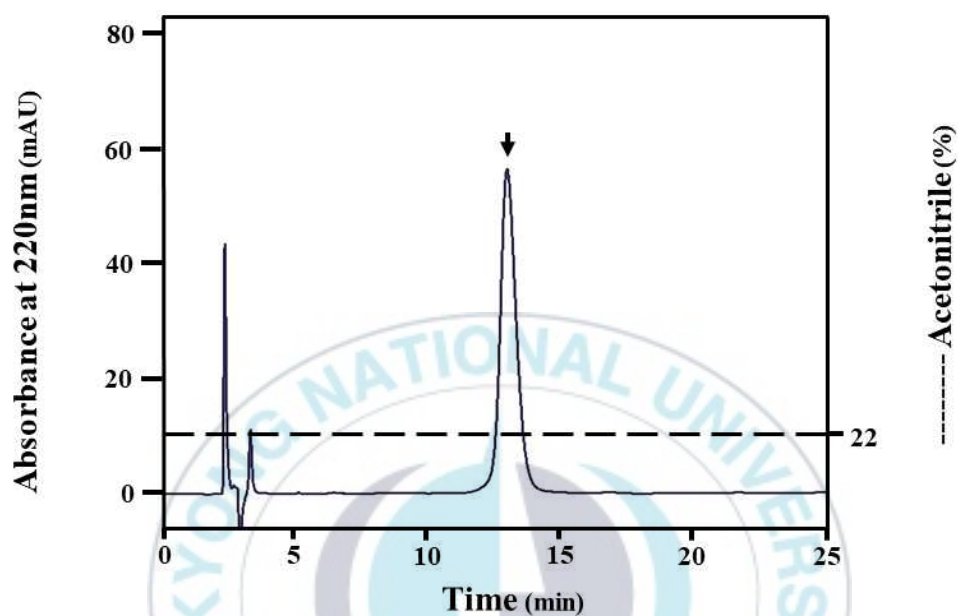


Figure 14. The final purification step of PvAMP2 from the active peak in fig. 13. Elution was performed with an isocratic condition of 22% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. The elution was monitored at a wavelength of 220 nm. Fraction (indicated by black arrow) with retention time of 12.3–13.5 min was collected and named PvAMP2. And the molecular weight of the PvAMP2 was analyzed by LC-MS.

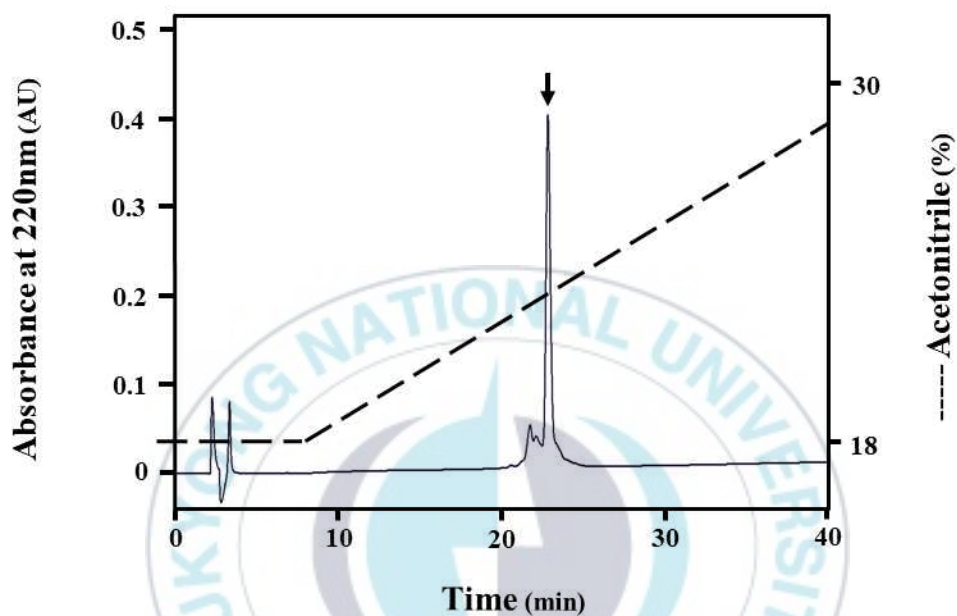


Figure 15. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of the fraction B in Fig. 11. Elution was performed with a linear gradient of 18–30 % ACN in 0.1 % TFA for 36 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by black arrow) of 23.0–23.2 % ACN, which was eluted at 23.0–23.5 min, showed antimicrobial activity and was used for final purification step. The eluate was monitored at 220 nm.

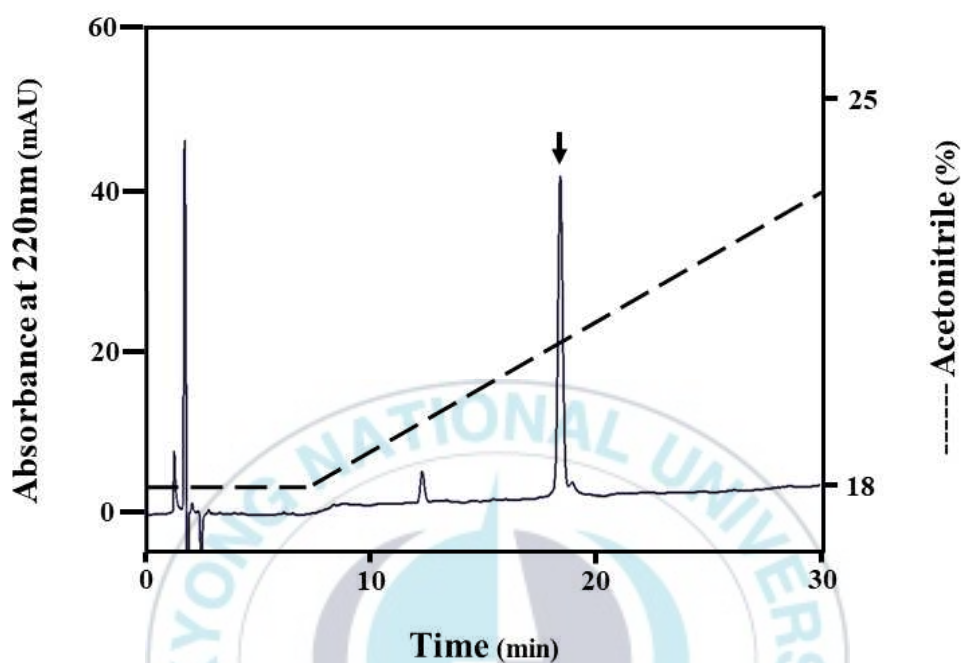


Figure 16. The final purification step of PvAMP3 from the active peak in fig. 15. Elution was performed with a linear gradient of 18–25 % ACN in 0.1 % TFA for 35 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. The elution was monitored at a wavelength of 220 nm. Fraction (indicated by black arrow) of 20.24–20.36% ACN eluted at 18.2–18.8 min was collected and named PvAMP3. And the molecular weight of the PvAMP3 was analyzed by LC–MS.

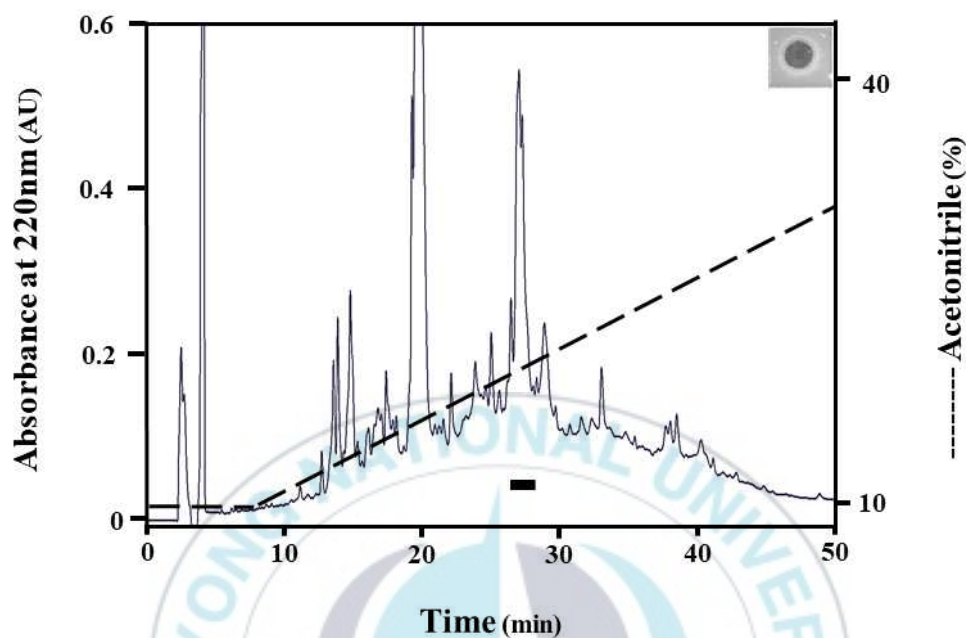


Figure 17. The 3rd reversed-phase HPLC chromatogram of 'F7' in fig. 7. Elution was performed with a linear gradient of 10–40% ACN in 0.1% TFA for 60 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fractions (indicated by black bar) of 18.95–20.15% ACN, which were eluted at 25.9–28.3 min, showed antimicrobial activity and was used for next purification step. The eluate was monitored at 220 nm. The URDA result of the fraction showing the greatest antibacterial activity among the fractions indicated by the black bar in the upper right is shown.

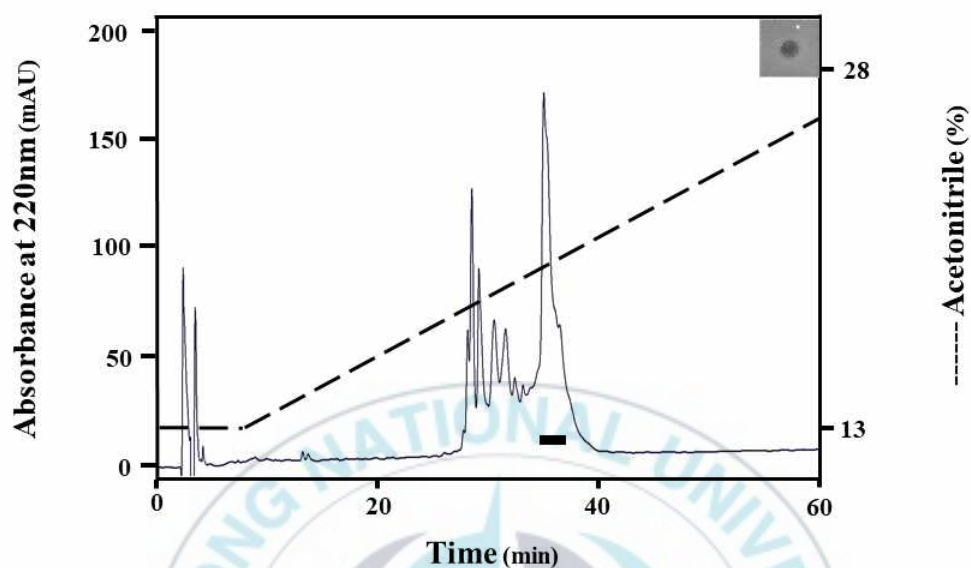


Figure 18. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of the active fraction in fig. 17. Elution was performed with a linear gradient of 13–28% ACN in 0.1% TFA for 60 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fractions (indicated by black bar) of 19.68–20.38% ACN, which were eluted at 34.7–37.5 min, showed antimicrobial activity and was used for next purification step. The eluate was monitored at 220 nm. The URDA result of the fraction showing the greatest antibacterial activity among the fractions indicated by the black bar in the upper right is shown.

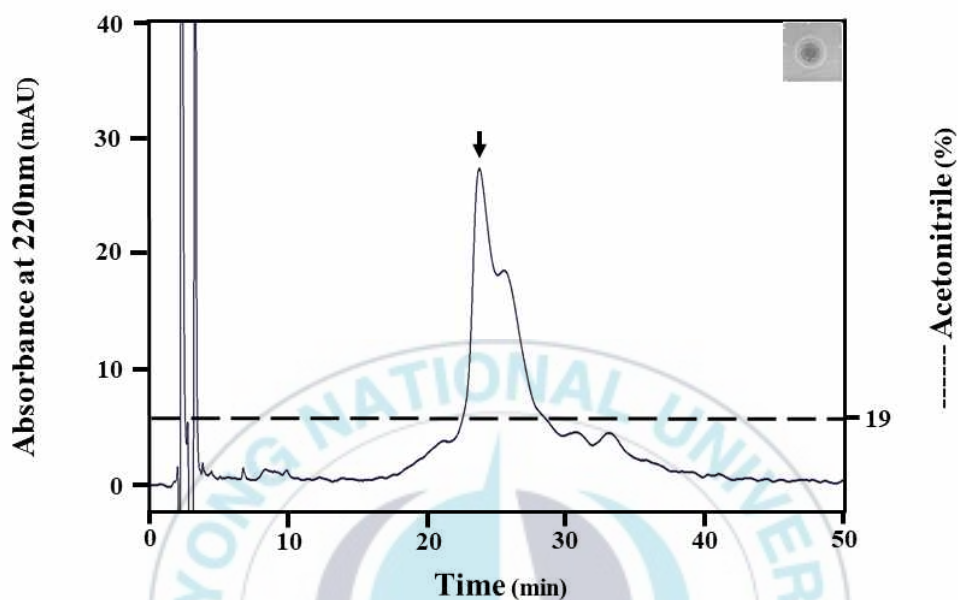


Figure 19. The 5th reversed-phase HPLC chromatogram of active fraction in fig. 18. Elution was performed with an isocratic condition of 19% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by black arrow) with retention time of 22.0–24.8 min showed antimicrobial activity and was used for final purification step. The eluate was monitored at 220 nm. URDA results of the fraction indicated by a black arrow in the upper right are shown.

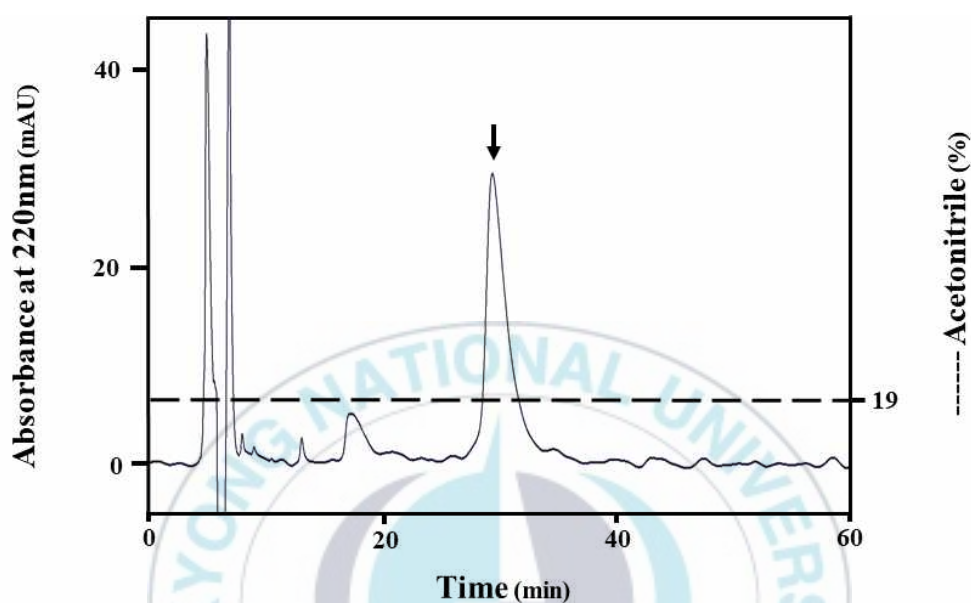


Figure 20. The final purification step of PvAMP4 from the active peak in fig. 19. Elution was performed with an isocratic condition of 19% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min on Capcell-Pak C18 column. The elution was monitored at a wavelength of 220 nm. Fraction (indicated by black arrow) with retention time of 28.8–31.4 min was collected and named PvAMP4. And the molecular weight of the PvAMP4 was analyzed by LC-MS.

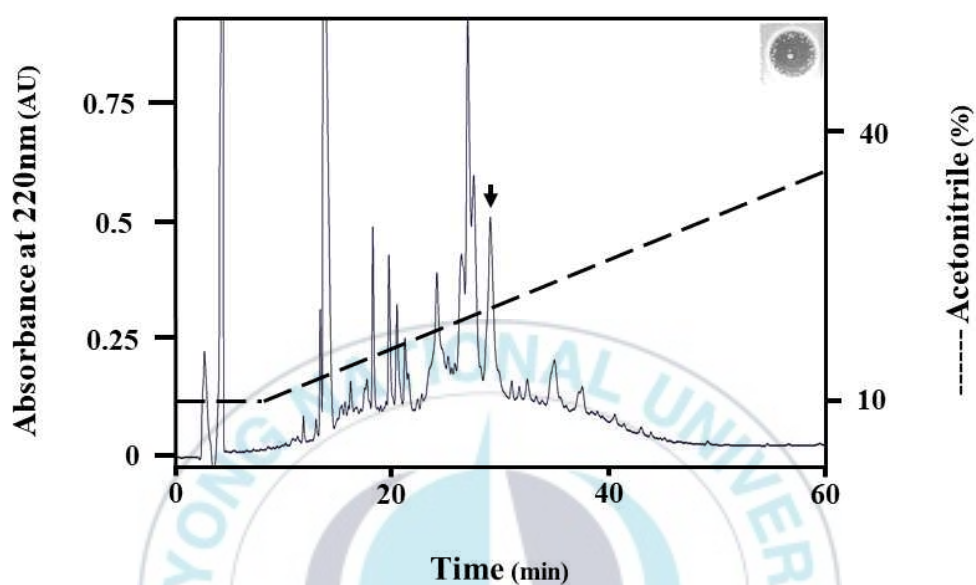


Figure 21. The 3rd reversed-phase HPLC chromatogram of 'F8' in fig. 7. Elution was performed with a linear gradient of 10–40% ACN in 0.1% TFA for 60 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by black arrow) of 20.25–21.4% ACN, which was eluted at 28.5–30.8 min, showed antimicrobial activity and was used for next purification step. The eluate was monitored at 220 nm. URDA result of the fraction indicated by a black arrow in the upper right are shown.

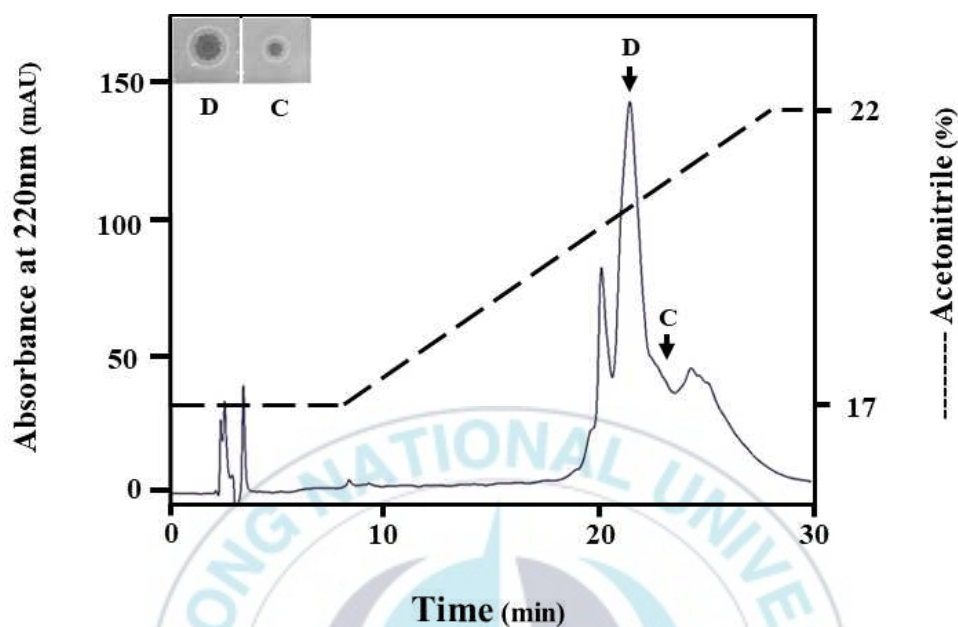


Figure 22. The 4th reversed-phase HPLC chromatogram of active fraction in fig. 21. Elution was performed 20 min of a linear gradient of 17–22% ACN and 20 min of 22 % ACN in 0.1% TFA stay at a flow rate of 1 mL/min using Capcell-Pak C18 column. Fraction D of 20.18–20.63% ACN was collected, which was eluted at 20.7–22.5 min. Fraction C with 20.63–20.93% ACN was collected, which was eluted at 22.5–23.7 min. The black arrows indicate the active fractions used for next and final purification steps and the eluate was monitored at 220 nm. URDA results for each fraction indicated by a black arrow in the upper left are shown.

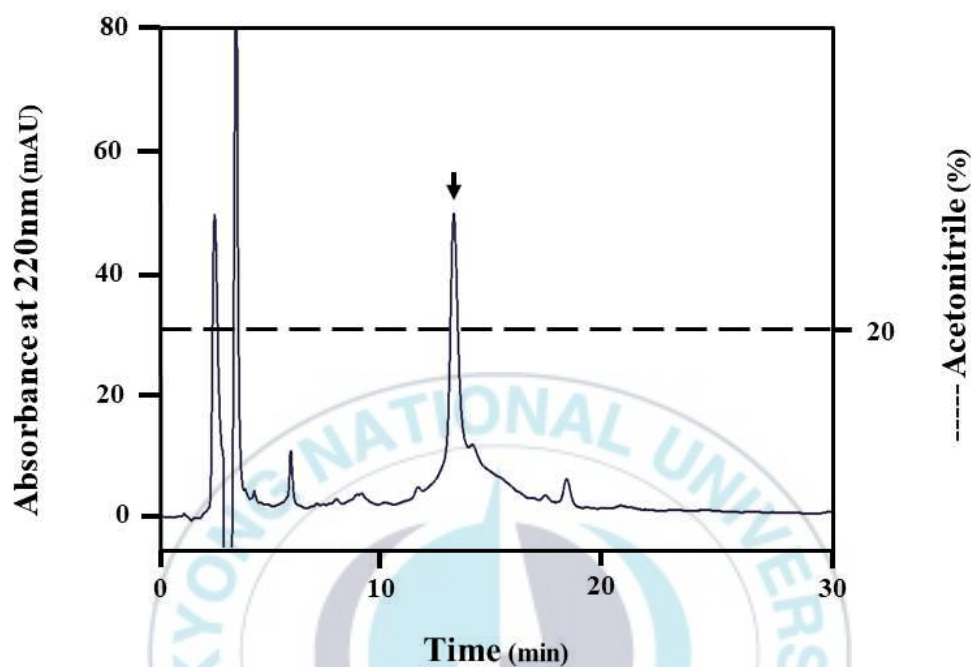


Figure 23. The final purification step of PvAMP5 from the active peak in fig. 22. The final purification step was performed using fraction C of Fig. 22. Elution was performed with an isocratic condition of 20% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. The elution was monitored at a wavelength of 220 nm. Fraction (indicated by black arrow) with retention time of 13.0–13.9 min was collected and named PvAMP5. And the molecular weight of the PvAMP5 was analyzed by LC-MS.

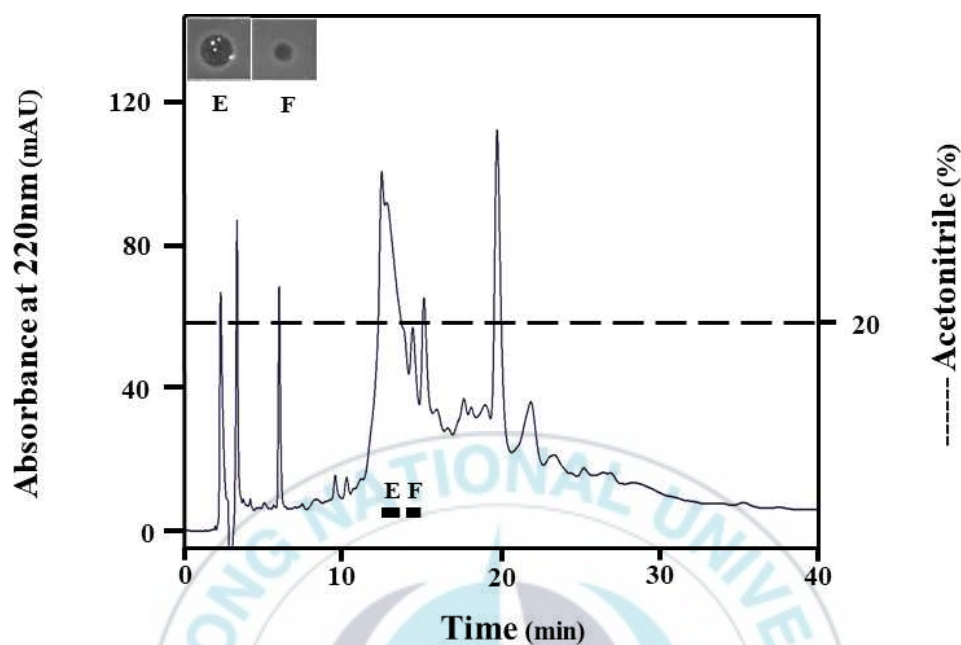


Figure 24. The 5th reversed-phase HPLC chromatogram of fraction D in fig. 22. Elution was performed with an isocratic condition of 19% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction E was eluted at 12.4–13.6 min and Fraction F was eluted at 14.3–14.9 min. The black bars indicate the active fractions used for next purification step and the eluate was monitored at 220 nm. The black bars indicate the active fractions used for next and final purification steps and the eluate was monitored at 220 nm. URDA results for each fraction indicated by a black bar in the upper left are shown.

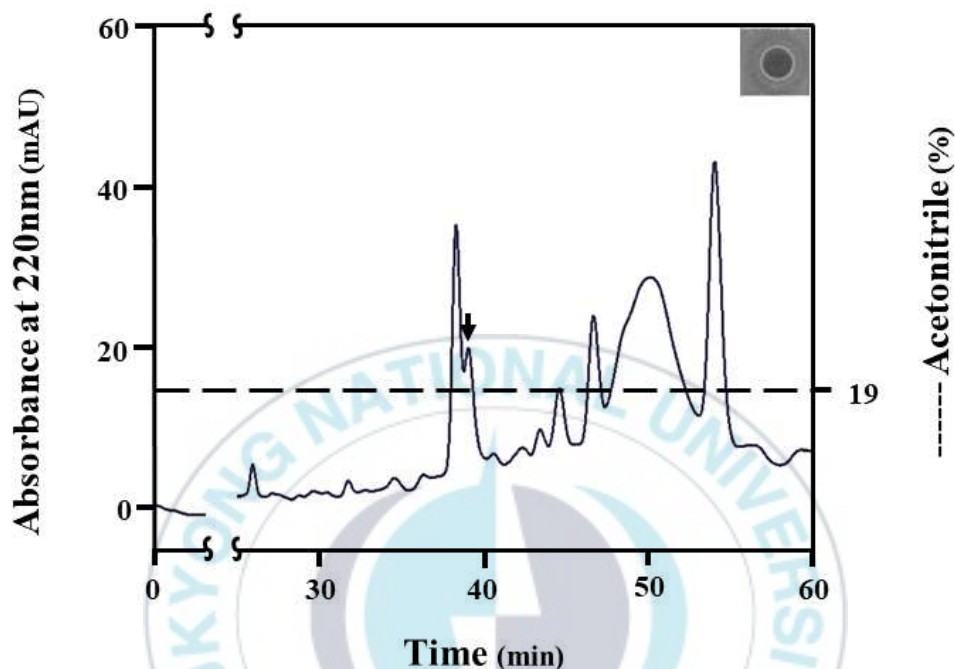


Figure 25. The 6th reversed-phase HPLC chromatogram of fraction E in fig. 24. Elution was performed with an isocratic condition of 19% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by black arrow) with retention time of 38.7–39.8 min showed antimicrobial activity and was used for next purification step. The eluate was monitored at 220 nm. URDA result of the fraction indicated by a black arrow in the upper right are shown.

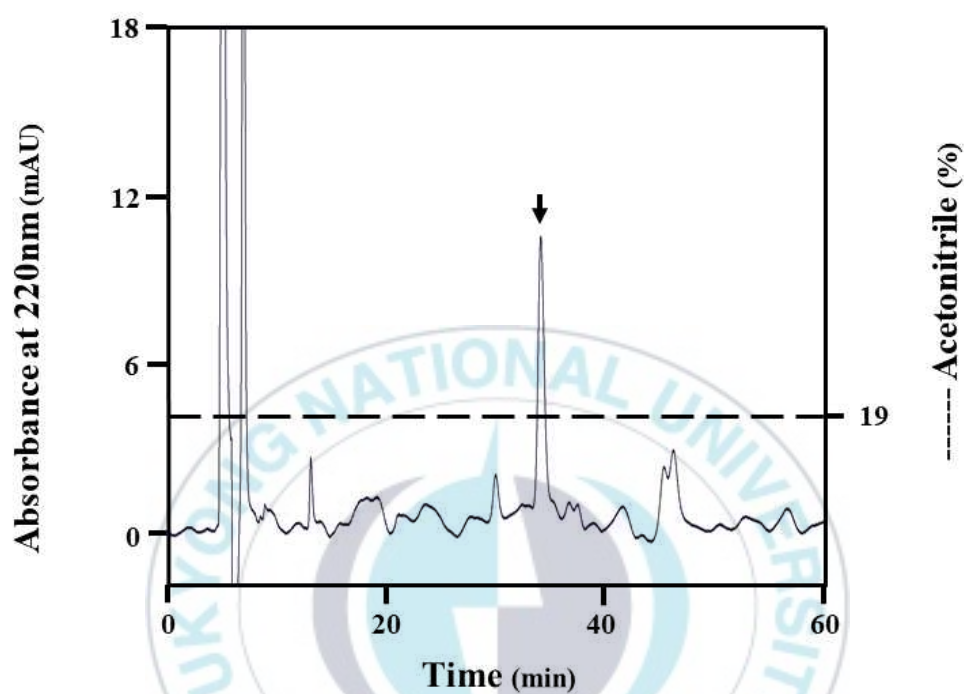


Figure 26. The 7th reversed-phase HPLC chromatogram of the active fraction in fig. 25. Elution was performed with an isocratic condition of 19% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by arrow) with retention time of 33.4–34.6 min was used for next purification step.. The eluate was monitored at 220 nm.

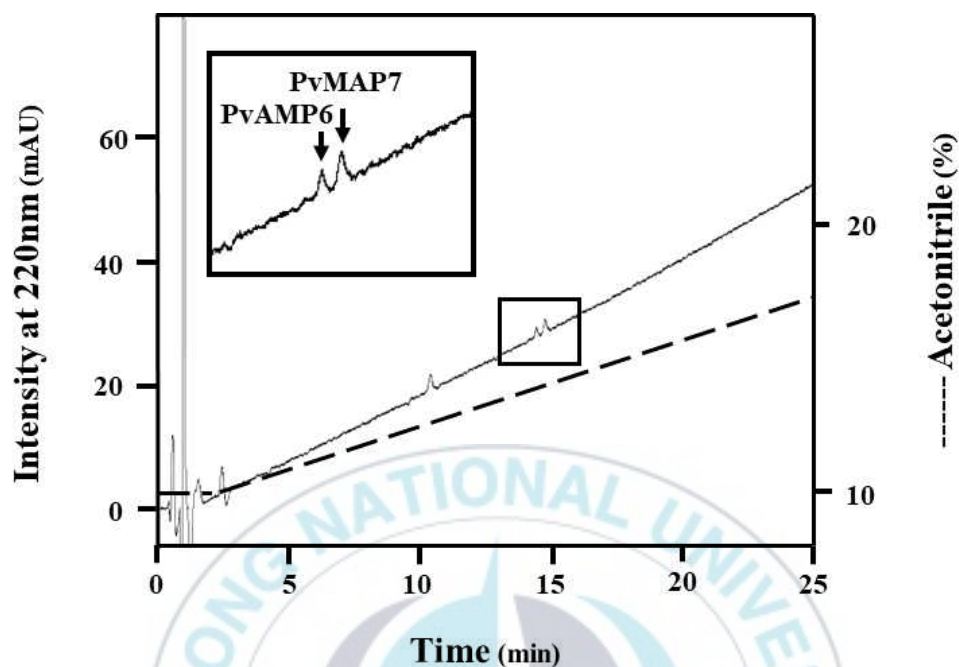


Figure 27. The final purification step of PvAMP6 and PvAMP7 from the active peak in fig. 26. Elution was performed with a linear gradient of 10–20 % ACN in 0.1 % FA for 30 min at a flow rate of 0.3 mL/min on Capcell-Pak C18 column. Fraction (indicated by arrow) of 14.36–14.42 % ACN eluted at 14.36–14.42 min was collected. And the other fraction (indicated by arrow) of 14.46–14.56 % ACN eluted at 14.7–15.0 min was collected. Fractions were named PvAMP6 and PvAMP7, respectively. And the molecular weight of the PvAMP6 and PvAMP7 was analyzed by LC-MS.

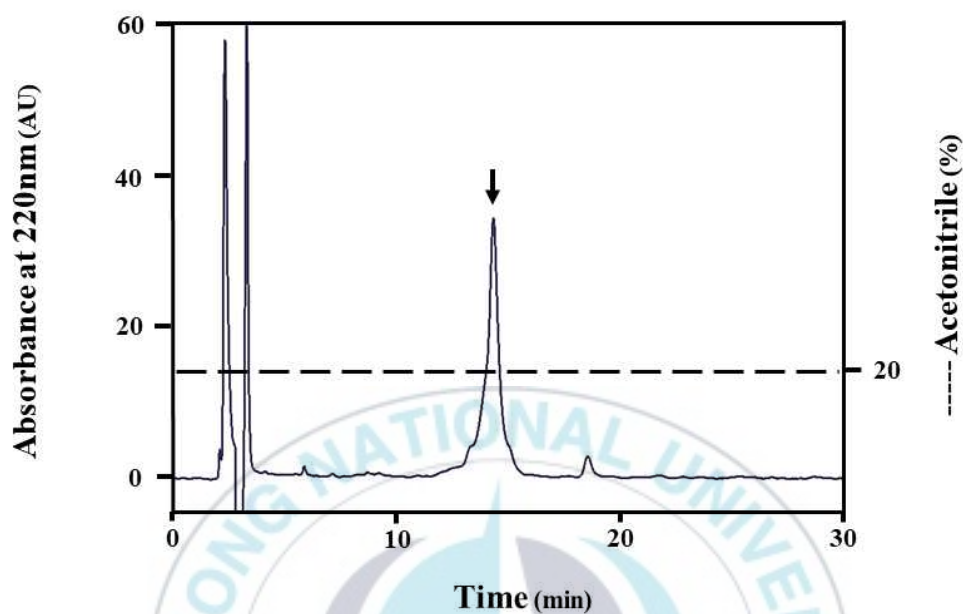


Figure 28. The final purification step of PvAMP8 from the active peak in fig. 24. The final purification step was performed using fraction F of Fig. 24. Elution was performed with an isocratic condition of 20% ACN in 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. The elution was monitored at a wavelength of 220 nm. Fraction (indicated by black arrow) with retention time of 13.6–15.2 min was collected and named PvAMP8. And the molecular weight of the PvAMP8 was analyzed by LC-MS.

5. 정제한 펩타이드의 특성 분석

5.1 PvAMP1와 PvAMP2

5.1.1 분자량 및 아미노산 서열 분석

최종 정제된 PvAMP1 및 PvAMP2의 분자량은 LC-MS를 통해 각각 7504.8665 Da과 4166.0555 Da으로 분석되었다 (Fig. 29과 30). 이후 아미노산 서열을 분석한 결과, 서열 정보를 얻을 수 없었다.

5.2 PvAMP3

5.2.1 분자량 및 아미노산 서열 분석

최종 정제된 PvAMP3의 분자량은 LC-MS를 통해 7990.9937 Da으로 분석되었다 (Fig. 31). 이 물질의 아미노산 서열을 분석한 결과, 서열 정보를 얻을 수 없었다.

PvAMP3의 부분적인 서열 분석을 위해 trypsin digestion을 진행하였다 (Fig 32). Sample을 처리하지 않은 negative control과 sample을 처리한 물질의 chromatogram를 비교하여, sample peak를 선별하였다. 모든 sample peak는 LC-MS를 사용하여 분자량 분석을 시도하였다. 그 중, peak 1과 peak 2에 대한 분자량과 아미노산 서열만이 분석되었다. Peak 1의 분자량은 1117.5045 Da이며, 아미노산 서열은 'SAGGGYGVGAAGGH'로 나타났다 (Fig. 33). Peak 2의 분자량은 1199.5717 Da이며, 아미노산 서열은 'SVFDYTPSGAR'로

확인했다 (Fig. 34).

5.2.2 Homology 분석

다른 중간 homology 분석을 위해, 분석된 peak 1과 peak 2의 아미노산 서열을 사용하여 NCBI blast를 수행하였다. Homology를 확인한 결과, peak 1과 peak 2의 아미노산 서열을 모두 포함하는 물질은 찾을 수 없었다.

5.3 PvAMP4.

5.3.1 분자량 및 아미노산 서열 분석

최종 정제된 PvAMP4의 분자량은 LC-MS를 통해 6751.8529 Da으로 분석하였다. PvAMP4의 아미노산 서열은 'KVHGSLARAGKVK GQTPXVDXQE'로 1번부터 23번까지의 서열이 분석되었다. 18번과 21번 서열은 분석되지 않았으며, 이를 X로 표시하였다 (Fig. 35).

5.3.2 Homology 분석

분석된 PvAMP4의 아미노산 서열과 다른 종의 homology 분석을 위해 NCBI blast를 사용하였다. Homology를 확인한 결과, 같은 멍게에 속하는 *Styela clava* (ref | XP_039271091.1 |), *Phallusia mammillata* (gb | CAB3244866.1 |), *Ciona intestinalis* (ref | XP_009859868.1 |), *Oikopleura dioica* (gb | CBY20862.1 |)의

Ubiquitin like protein (UBL)과 높은 유사성을 나타냈다. 이외에도 물고기에 속하는 *Oncorhynchus gorboscha* (ref | XP_04617329 9.1 |), *Syngnathus acus* (ref | XP_037101200.1 |), *Colossoma macropomum* (ref | XP_036450212.1 |), *Acanthopagrus latus* (ref | XP_036943037.1 |)의 ubiquitin like and ribosomal protein S30과 높은 유사도를 나타냈다 (Fig. 36). 따라서 PvAMP4는 ribosomal protein S30 (RPS30)인 것으로 예상된다.

5.4 PvAMP5

5.4.1 분자량 및 아미노산 서열 분석

최종 정제된 PvAMP5의 분자량은 LC-MS를 통해 1652.8301 Da인 것으로 분석하였다. PvAMP5의 아미노산 서열은 'NWEQGAGK RFXN'으로 12번까지의 서열을 분석할 수 있었다. 11번 서열은 분석되지 않았으며, 이를 X로 표시하였다 (Fig. 37).

5.4.2 Homology 분석

분석한 PvAMP5의 아미노산 서열과 다른 종의 homology 분석을 위해, NCBI blast를 사용하였다. 그 결과, 성게에 속하는 *Strongylocentrotus purpuratus* (ref | XP_796918.1 |)의 retinol bindin protein, *Strongylocentrotus purpuratus* (ref | XP_011671 261.1 |)와 *Lytechinus variegatus* (ref | XP_041486026.1 |)의 fatty acid-binding protein과 높은 유사성을 나타냈다. 이외에도

명계에 속하는 *Styela clava*의 myotubularin-related protein과도 유사한 서열을 가지고 있음을 확인하였다 (Fig. 38).

5.5 PvAMP6~8

5.5.1 분자량 및 아미노산 서열 분석

최종 정제된 PvAMP6~8의 분자량은 LC-MS를 통해 각각 791.4060 Da, 807.4009 Da 및 879.4214 Da으로 분석되었다. 또한 각각의 아미노산 서열을 분석한 결과, 'GFALGGGGVG', 'GFSLGGGGVG' 및 'GFDLTGGGGVG'로 모두 10개의 아미노산으로 구성되어 있는 것을 확인하였다 (Fig. 39).

5.5.2 Homology 분석

분석한 PvAMP6~8의 아미노산 서열의 homology 분석을 위해, NCBI blast를 사용하였다. 결과적으로, 성계에 속하는 *Hemicentrotus pulcherrimus* (gb | BAA07502.1 |), *Strongylocentrotus purpuratus* (ref | NP_999771.1 |), *Tripneustes gratilla* (prf | 1616199A | , prf | 1616199B | , prf | 1616199C |), *Mesocentrotus nudus* (prf | 1616199J | , prf | 1616199M | , prf | 1616199N |), *Echinometra mathaei* (prf | 1616199P | , prf | 1616199Q | , prf | 1616199R |), *Heterocentrotus mammillatus* (prf | 1616199T | , prf | 1616199U | , prf | 1616199V |)의 sperm activating peptide (SAP)와 homology가 높은 것으로 나타났다 (Fig. 40).

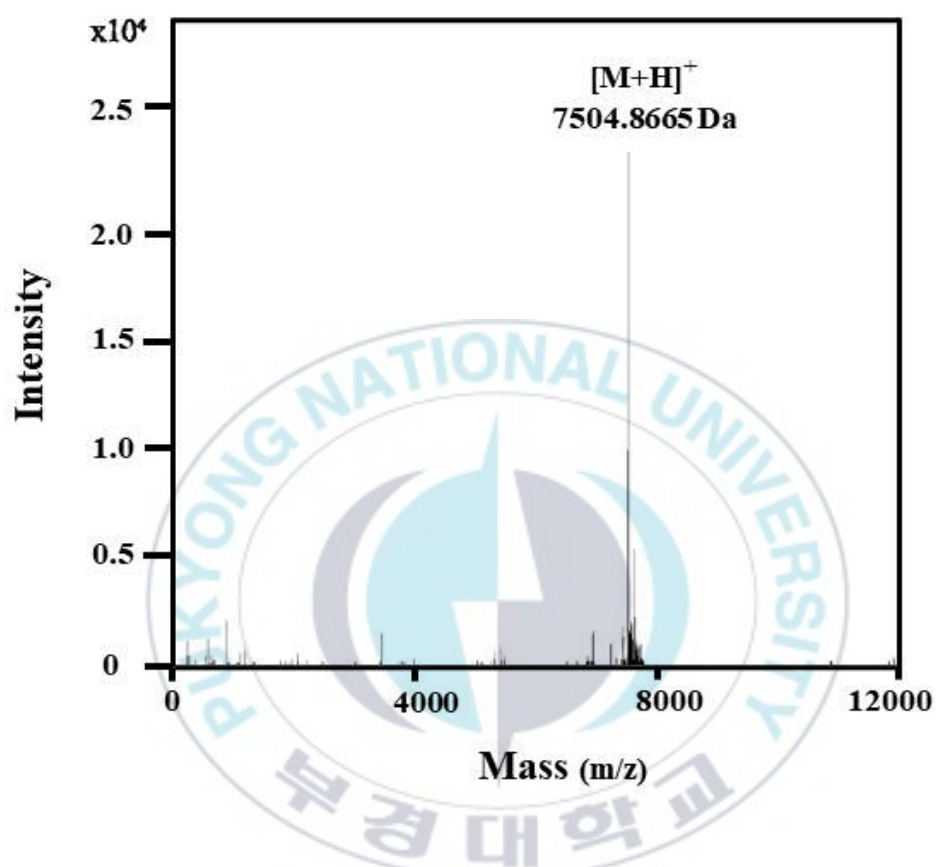


Figure 29. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP1 in fig. 10. The molecular weight of PvAMP1 determined using an Ultra High-Resolution Q-TOF LC-MS/MS spectrometer was 7504.8665 Da. As a result of analyzing the amino acid sequence by Edman degradation, the N-terminus was blocked.

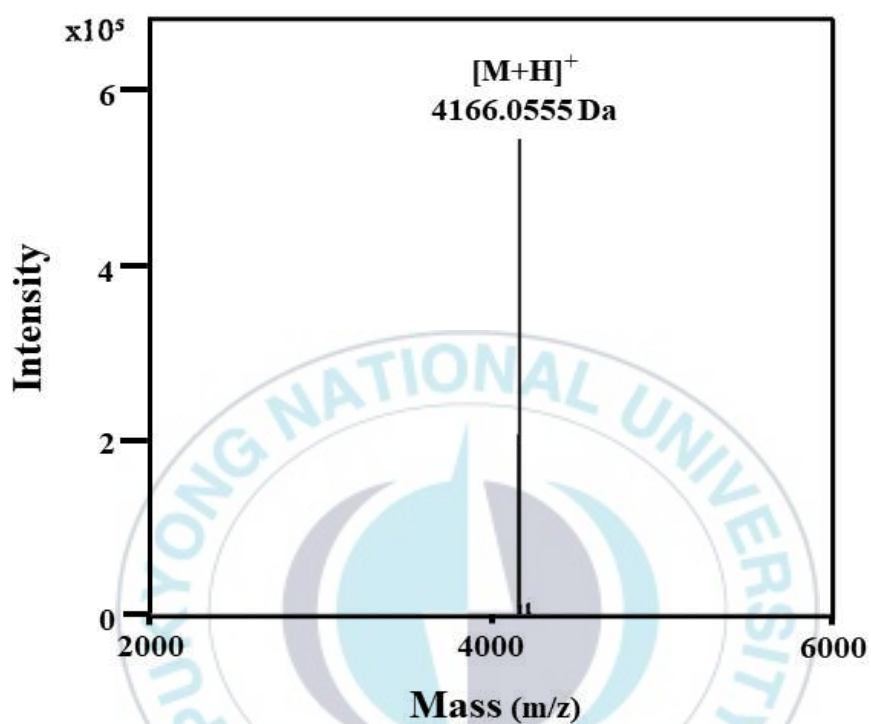


Figure 30. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP2 in fig. 14. The molecular weight of PvAMP2 determined using an Ultra High-Resolution Q-TOF LC-MS/MS spectrometer was 4166.0555 Da. The N-terminal sequencing of PvAMP2 through Edman degradation yielded no sequence information because the N-terminus of PvAMP2 was blocked.

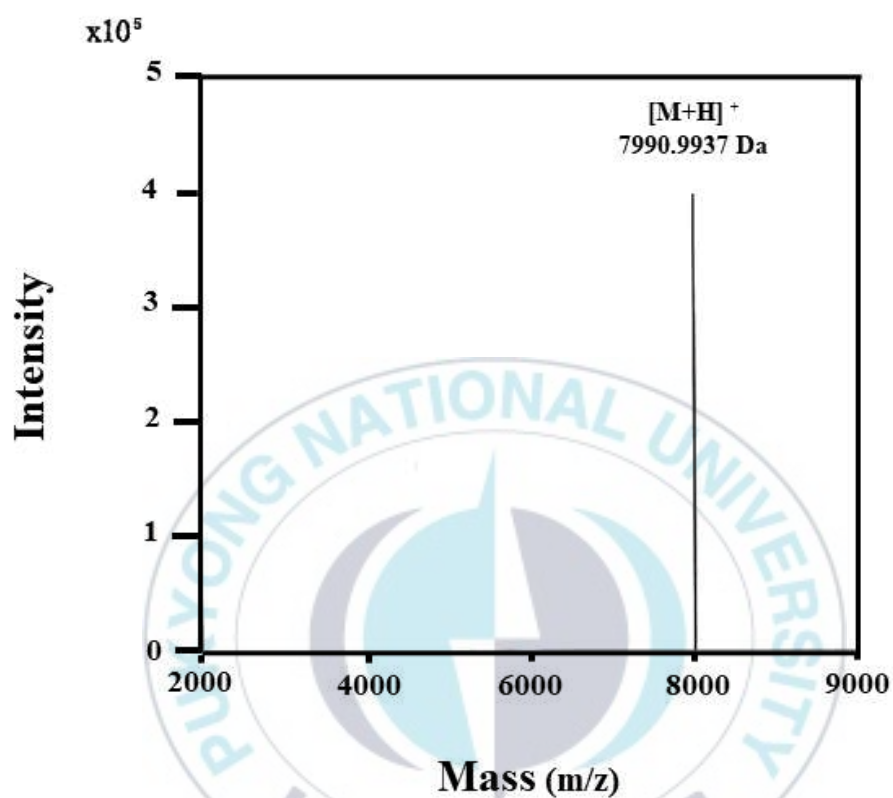


Figure 31. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP3 in fig. 16. The molecular weight of PvAMP3 determined using an Ultra High-Resolution Q-TOF LC-MS/MS spectrometer was 7990.9937 Da. The N-terminal sequencing of PvAMP3 through Edman degradation yielded no sequence information because the N-terminus of PvAMP3 was blocked.

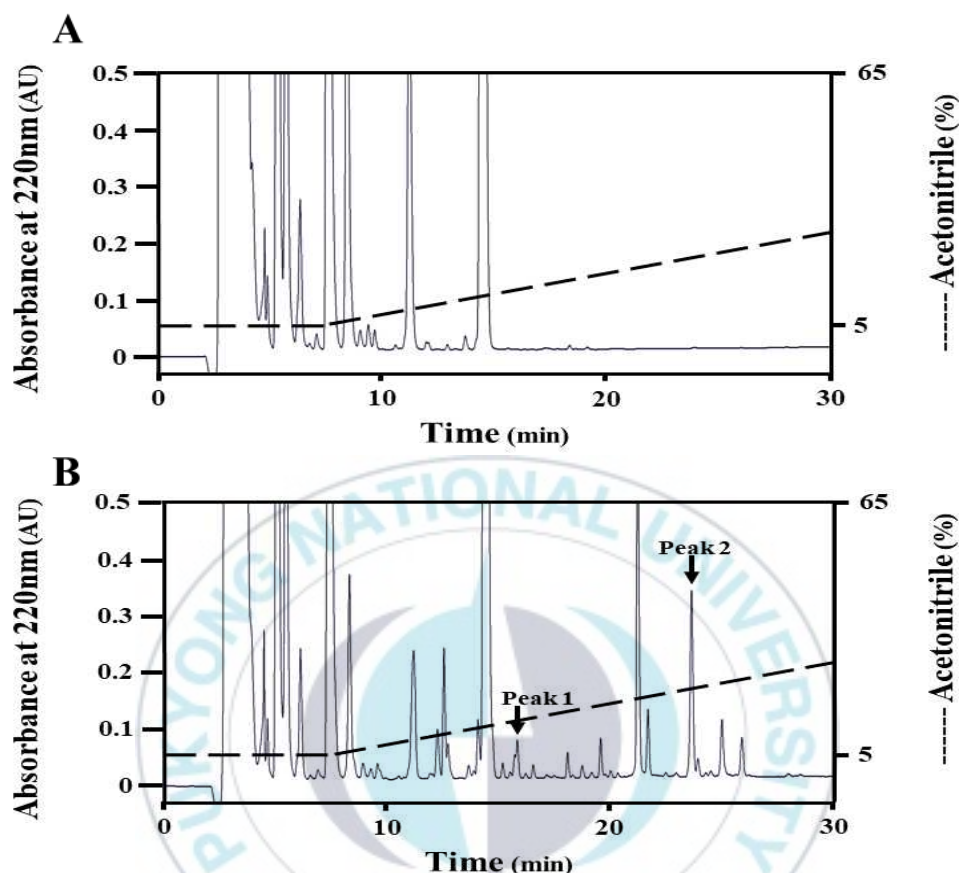


Figure 32. Isolation of trypsin-treated sample peaks through comparison of HPLC chromatograms of PvAMP3 absent (A) and present (B) trypsin-treated samples. Elution was performed with a linear gradient of 5–65 % ACN in 0.1 % TFA for 60 min at a flow rate of 1 mL/min on Capcell-Pak C18 column. The eluate was monitored at 220 nm. The two HPLC chromatograms were compared to isolate the peak of the cleavage material after trypsin digestion. All the isolated peaks were analyzed molecular weight through LC-MS. Only peaks 1 and 2, whose molecular weights were analyzed, were indicated.

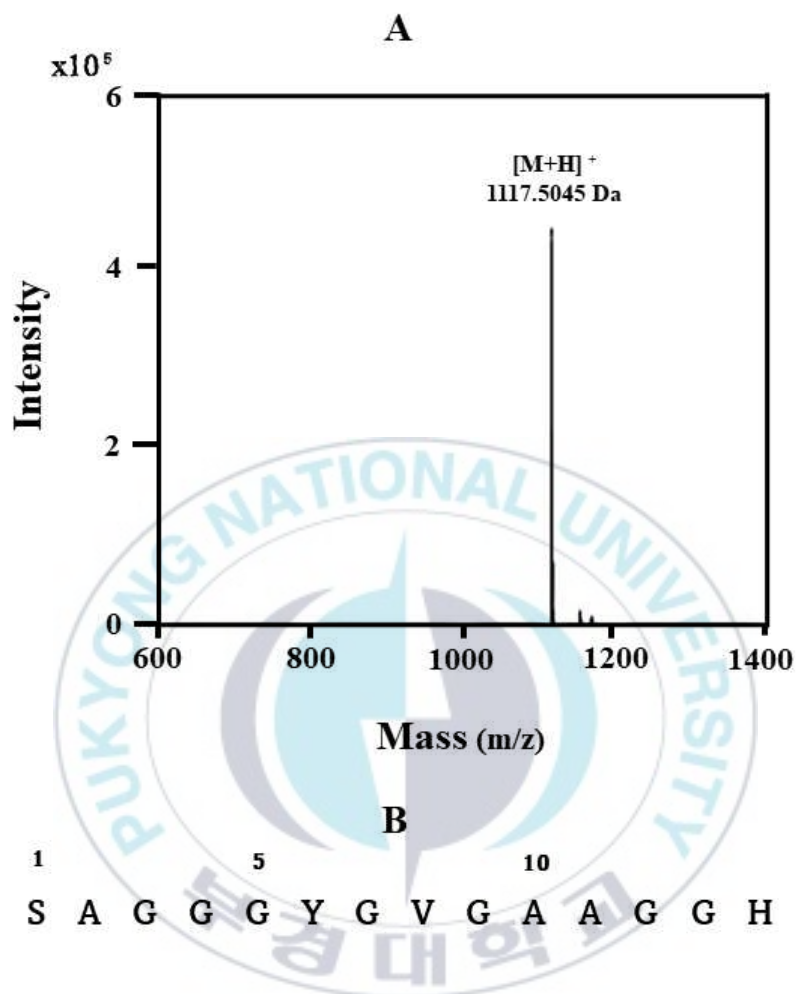


Figure 33. Determination of molecular weight and N-terminal sequencing of peak 1. (A) The molecular weight of peak 1 determined using an Ultra High-Resolution Q-TOF LC-MS/MS spectrometer was 1117.5045 Da. (B) The N-terminal sequencing of peak 1 through Edman degradation yielded partial sequence information of 14 amino acid residues.

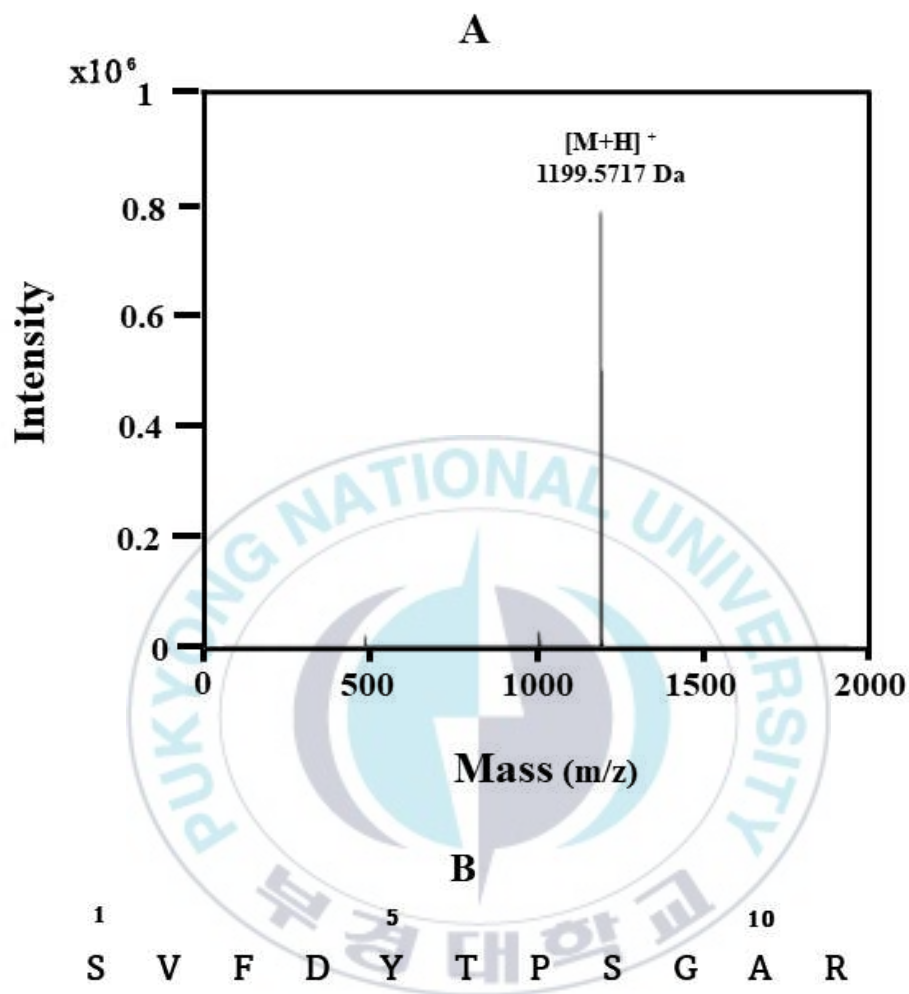


Figure 34. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of peak 2. (A) The molecular weight of peak 1 determined using an Ultra High-Resolution Q-TOF LC-MS/MS spectrometer was 1199.5717 Da. (B) The N-terminal sequencing of peak 2 through Edman degradation yielded partial sequence information of 11 amino acid residues.

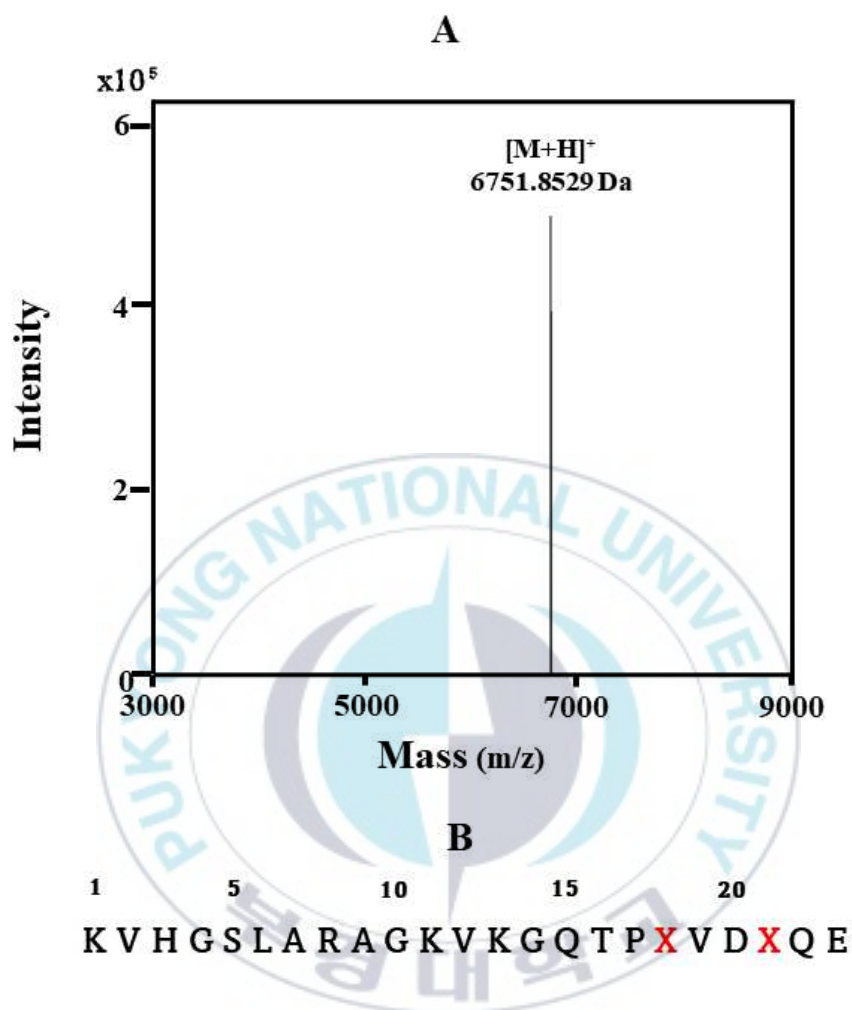


Figure 35. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP4 in fig. 20. (A) The molecular weight of PvAMP4 determined using an Ultra High-Resolution Q-TOF LC-MS/MS spectrometer was 6751.8529 Da. (B) The N-terminal sequencing of PvAMP4 through Edman degradation yielded partial sequence information of 23 amino acid residues.

Tunicate	[	<i>P. vittata (PvAMP4)</i>	-----
		<i>S. clava</i>	-----MQLFLQAEQLHCVQVDGHEVATLKHIALREGISVDDQILTCGGRIIEDELSINDSLQNL
		<i>P. mammillata</i>	-----MQLFLRSDKLHCVCVDENDLVLSLVERIQSLEGLSFEDCVLSYHGTVLEVEQTIAGAGISDL
		<i>C. intestinalis</i>	-----MQIFLKTNELHCVQVDSDGLVSNLKAQINAIEGIATEDCVLSYNGITLDDDLSEAAGLNDL
		<i>O. dioica</i>	-----MHFSFQGG---SFNAENTDEVLSLFN-----EETYAVVNGRVIQPGFSLEEFGLTEG
Fish	[	<i>O. gorbuscha</i>	MKCFLEFSISRENTICEAHDYYTARFWLTMQLFVRAQTLHTFCVSGLETVADIKAHIEALEGLSCDDQVVFLCGEPLCDDAVICQS-ALEF
		<i>S. acus</i>	MRSRVPSNSLSYAARLTTSICTS---INMQLFLRAQNTHTLEVTVGQETVVGCIKAHVQTLLEGLLVENCQVLLAGCPLEDDASLASCQVSEH
		<i>C. macropomum</i>	MRCRTHPFAHVR--SWRVDLGVNR--LKMQLFVRAQSLHTVEVDGSETVAHIKAQIEALEGLSCDDQILTLRGTFPLQDEALIGCSGIEEF
		<i>A. latu</i>	MRSVGPTALSMPS-VERLASTS---IKMQLFLRAQNTHTLEVTVGQETVVGCIKAHVQAVEGLLVEDQVLLLAGCPLEDDSSSLASCQVSEH
		<i>P. vittata (PvAMP4)</i>	-----KVHGSLARAGKVRGCTEXVDXGE-----
		<i>S. clava</i>	CTLDVSSRLGGKVHGSLARAGKVRGCTERVVDHCEKKKKKTGRAKRRMCYNRRFVNVVPTFGRRRGPNNS
		<i>P. mammillata</i>	ATIDILGRLHGGKVHGSLARAGKVRGCTERVVDACEKKKKKTGRAMRRMCYNRRFVNVVPTFGRRRGPNNS
		<i>C. intestinalis</i>	STVCVLGRVLGGKVHGSLARAGKVRGCTERVVDACEKKKKKTGRAKRRMCYNRRFVNVVPTFGRRRGPNNS
		<i>O. dioica</i>	FCVEEVPRMLGGKVHGSLARAGKVRGCTERVVDACEKKKAKTGRAKRRMCYNRRFVNVVPSFGKKKGPNNS
		<i>O. gorbuscha</i>	STLEVTPRLLGGKVHGSLARAGKVRGCTERVVDHCEKKKKKTGRAKRRICYNRRFVNVVPTFGKKKGPNNS
		<i>S. acus</i>	CTLEVAARLLGGKVHGSLARAGKVRGCTERVVDHCEKKKKKTGRAKRRICYNRRFVNVVPTFGKKKGPNNS
		<i>C. macropomum</i>	STIEVSSRLGGKVHGSLARAGKVRGCTERVVDHCEKKKKKTGRAKRRICYNRRFVNVVPTFGKKKGPNNS
		<i>A. latu</i>	CTLEVAGRLLGGKVHGSLARAGKVRGCTERVVDHCEKKKKKTGRAKRRICYNRRFVNVVPTFGKKKGPNNS

Figure 36. Homology analysis of the analyzed amino acid sequence of PvAMP4 with other sea squirt and fish species. Amino acid sequences only from fish and tunicate, which were analyzed the highest similarity with 'PvAMP4', were shown.; ubiquitin like protein (*Styela clava*, *Phallusia mammillata*, *Ciona intestinalis* and *Oikopleura dioica*), ubiquitin like and ribosomal protein S30 (*Oncorhynchus gorbuscha*, *Syngnathus acus*, *Colossoma macropomum* and *Acanthopagrus latus*). Black boxes indicate conserved parts and gray boxes indicate similar parts.

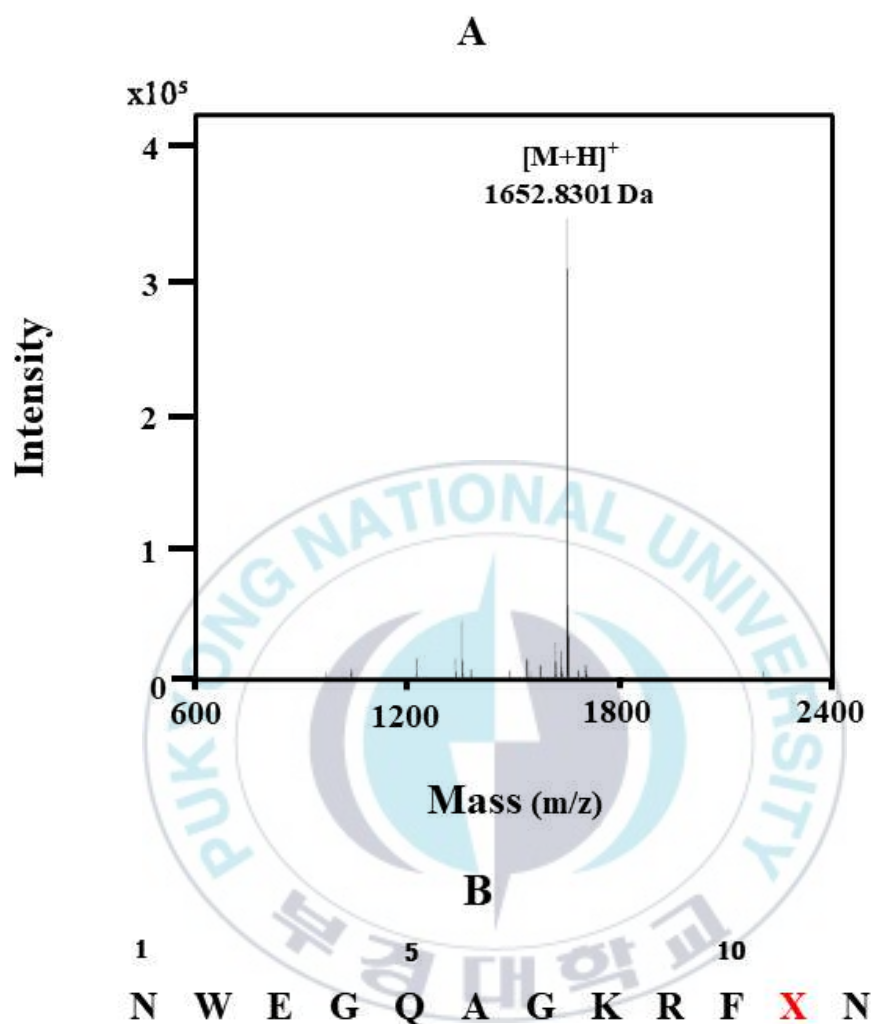


Figure 37. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP5 in fig. 23. The molecular weight of PvAMP5 determined using an Ultra High-Resolution Q-TOF LC-MS/MS spectrometer was 1652.8301 Da. The N-terminal sequencing of PvAMP5 through edman degradation yielded partial sequence information of 12 amino acid residues.

<i>P. vittata</i> (PvAMP5)	-----
<i>S. purpuratus</i> (RBP)	MADFSGKWVFDHGENMEFLIEKLIKIDPSKIPSDKSSTVEIVQNGDNFKIKTTGSGGKSRDISYSIGQSFI
<i>S. purpuratus</i> (FABP)	MADFSGKWAFDHGENMESLVDKLIKIDPAKIPKDRSTTVEITQNGDNFHIVSAG-GGRNRDMSFTIGKAFV
<i>L. variegatus</i> (FABP 1)	MADFSGKWVFDHGENMEFLIEKLIKIDPAKIPSDKSTTVVIAQNGDTFNIKTTTAGGKTRDITYSIGQSFI
<i>L. variegatus</i> (FABP 2)	MADFSGKWVFDHAENMETLADKLIKIDPAKIPKDRSTTVEITQNGDNFHIVSVG-GGRTRDMNFTIGKSEV
<i>P. vittata</i> (PvAMP5)	-----NWEGQAGKRFXN--
<i>S. purpuratus</i> (RBP)	DPDIKELRGKEIEVTPSWQGGKLVLAGPKG-NSATREMVGACMVVTFNWEGQAGKRFFNKA
<i>S. purpuratus</i> (FABP)	DPDILELRNKEIQVTPNWNGNKLVLTPGPKGTNSATREIVGSQMVVTFNWEGTVGKRFFNKA
<i>L. variegatus</i> (FABP 1)	DPDIKELRGKEIEVTPSWEGSKLVLAGPKG-NSASREIVGSQMVVTFNWEGQAGKRFFNRA
<i>L. variegatus</i> (FABP 2)	DPDILELRGKEIQVTPSWNGSKLVLTGPKGNTSAAREMVGSCMVVTFNWEGVVGKRFFNRA

Figure 38. Homology analysis of the analyzed amino acid sequence of PvAMP5 with sea urchin. Amino acid sequences only from sea urchin, which were analyzed the highest similarity with PvAMP5, were shown; retinol-binding protein (RBP) from *Strongylocentrotus purpuratus*, fatty acid-binding protein (FABP) from *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus variegatus*. Black boxes indicate conserved amino acid sequences.

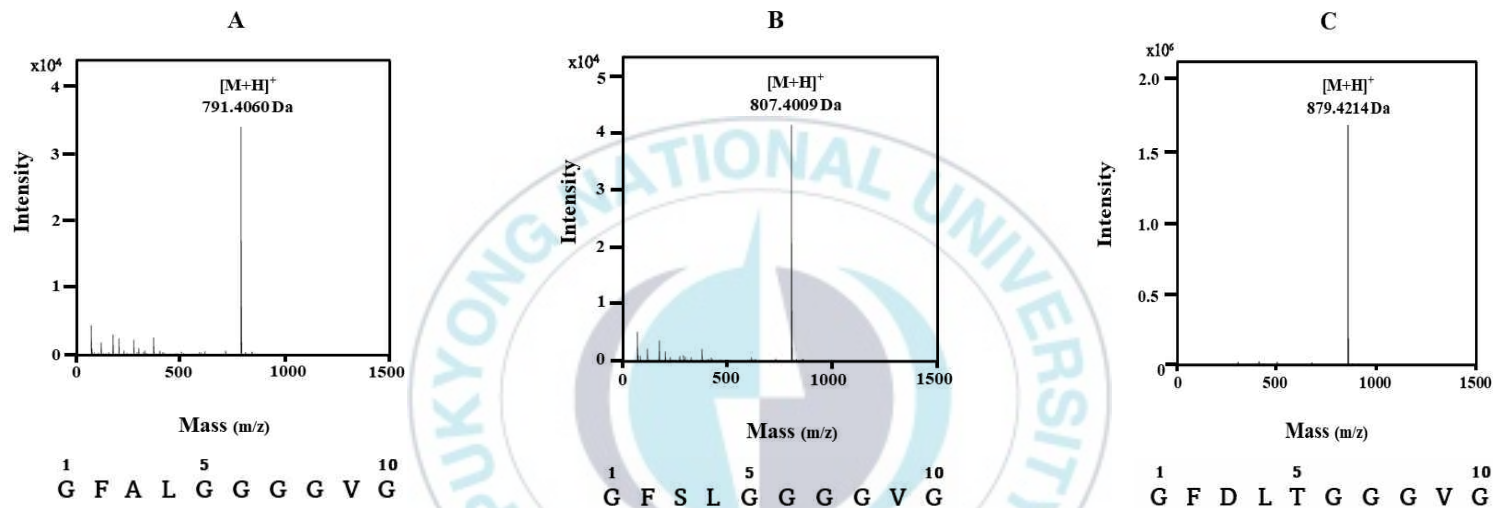


Figure 39. Determination of molecular weight by LC-MS analysis and N-terminal sequencing of PvAMP6~8 in fig. 27 and 28. The molecular weight of PvAMP6~8 is 791.4060, 807.4009 and 879.4214 Da, respectively. The N-terminal sequencing of PvAMP6~8 through edman degradation yielded sequence information of 10 amino acid residues.

<i>P. vittata</i> (PvAMP6)	GFAIGGGGVG
<i>P. vittata</i> (PvAMP7)	GFSIGGGGVG
<i>P. vittata</i> (PvAMP8)	GFDLTGGGVG
<i>S. purpuratus</i> I	GFAIGGGGVG
<i>S. purpuratus</i> II	GFDINGGGVG
<i>S. purpuratus</i> III	GFSITGGGVG
<i>H. pulcherrimus</i> I	GFAIGGGGVG
<i>H. pulcherrimus</i> II	GFEINGGGVG
<i>H. pulcherrimus</i> III	GFDLTGGGVG
<i>T. gratilla</i> I	GFNINGGGVG
<i>T. gratilla</i> II	GFDINGGGVG
<i>T. gratilla</i> III	GFSIGGGGVG
<i>M. nudus</i> I	GFSISGGGVG
<i>M. nudus</i> II	GFAIGGGGVG
<i>M. nudus</i> III	GFDLTGGGVG
<i>E. mathaei</i> I	GYSISGGAVD
<i>E. mathaei</i> II	GFNISGGGVG
<i>E. mathaei</i> III	GYNINGDRID
<i>H. mammillatus</i> I	GTLPTGSGVS
<i>H. mammillatus</i> II	GFEMGGTGVG
<i>H. mammillatus</i> II	GYNIGGGGID

Figure 40. Homology analysis of the analyzed amino acid sequence of PvAMP6~8 with sea urchin. Amino acid sequences only from sea urchin, which were analyzed the highest similarity with PvAMP6~8, were shown; sperm activating peptide from *Strongylocentrotus purpuratus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Tripneustes gratilla*, *Mesocentrotus nudus*, *Echinometra mathaei* and *Heterocentrotus mammillatus*. Black boxes indicate conserved parts and gray boxes indicate similar parts.

6. PvAMP4의 서열 및 특징 분석

6.1 서열 분석

PvAMP4의 전체 아미노산 서열을 얻기 위해, cDNA cloning을 진행하였다. Clone 서열 분석결과 5' untranslated region (UTR)이 23bp, ORF가 402bp 그리고 3' UTR이 76bp로 이루어진 물질인 것으로 분석되었다. 이후 ORF를 아미노산 서열로 번역한 결과, 134개의 아미노산으로 구성되어 있는 것을 확인하였다. Edman degradation을 통해 얻은 PvAMP4의 서열과 alignment을 진행한 결과, 76번 아미노산 서열부터 일치하는 것을 확인하였다. 분석되지 않은 서열은 'K'인 것으로 나타났다. 결론적으로 분석된 뉴클레오타이드 서열은 ubiquitin like protein과 ribosomal protein S30 (RPS30)이 결합된 단백질인 것으로 확인하였다 (Fig. 41). 추가적으로 76번 서열부터 134번까지, 총 59개 아미노산 서열의 분자량을 계산하였다. 그 결과, 6735.76 Da으로 확인되었으며, 이는 PvAMP4의 분자량인 6751.8529 Da과 동일하지 않았다. 따라서 PvAMP4와 서열이 유사한 isomer의 서열이 분석된 것으로 판단하였다.

6.2 Identity

분석된 59개의 RPS30 서열을 사용하여, 이전 homology 분석에 사용했던 다른 멧게의 아미노산 서열과 identity를 비교하였다. 그 결과, *Styela clava*와 98.31 %, *Phallusia mammillata*와 91.53 %, *Ciona intestinalis*와 89.83 % 그리고 *Oikopleura dioica*와 89.83

%의 identity를 나타냈다. 각각의 분자량은 6763.78 Da, 9740.77 Da, 6678.71 Da 그리고 6551.56 Da으로 계산되었다 (Fig. 42).

6.3 3D modeling

3D modeling을 위해 SWISS-MODEL server에 PvAMP4 isomer의 전체 아미노산 서열을 입력하였다. European rabbit 40S HCV-IRES complex에 있는 40S RPS30 (PDB accession no. 5flx.1.5)의 아미노산 서열과 alignment된 결과를 기반으로 3D 구조가 분석되었다. European rabbit의 40S RPS30과 본 연구에서 정제한 PvAMP4의 isomer는 일차구조 서열에서 89.83%의 identity를 나타내었다. 또한 3D modeling에 의하면, PvAMP4의 isomer는 3개의 loop에 의해 분리된 2개의 α -helix를 가지는 입체 구조를 취하는 것으로 확인하였다 (Fig. 43).

1 GTAAACGCTCGTCATAGAATAACGATGATGCAGCTCTTCGTACGCGCACAAAGATCTCCATTGTTTGGAGGTAGAAGGCGATCAGTCGATTC 90
M M Q L F V R A Q D L H C L E V E G D Q S I

91 TCCATCTAAAAAACAGATCTATGCTATTGAAGGCCTTGATGTTGAAGATCAGGTGCTAAGTCATGGAGGCCGTCCACTTGAGAATGATA 180
L H L K K Q I Y A I E G L D V E D Q V L S H G G R P L E N D

181 TGTCTTAATGGAAGCAGGACTGAGCGATCTCTCAACTGTGGATGTGCTTTGGGAGGCTTTTGGGAGGAAAGGTCCATGGATCTCTTGCTC 270
M S L M E A G L S D L S T V D V L G R L L G G K V H G S L A

271 GTGCTGGTAAAGTTAAGGGCCAACTCCAAAAGTGGATAAGCAAGAAAAGAAAAACAAAAGACTGGTCGTGCCAAGAGACGCATGCAAT 360
R A G K V K G Q T P K V D K Q E K K K Q K T G R A K R R M Q

361 ATAACCGTCGCTTTGTCAATGTCGTTCTACTTTTGGCAGAAGGAAAGGTCCGAACTCAAATTCCTAAATATTTGCTGGTTTAAAGGGC 450
Y N R R F V N V V P T F G R R K G P N S N S *

451 TAAATAAAATCGTTCAAGATTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 501

Figure 41. The full nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of PvAMP4's isomer determined by cDNA cloning. Through cDNA cloning, it was identified as a protein consisting of 23bp 5'UTR, 402bp ORF, and 76bp 3'UTR. Also, as a result of the amino acid translation, it was predicted to be a protein in which a ubiquitin-like protein (yellow) composed of 75 amino acids and ribosomal protein S30 (blue) composed of 59 amino acids were combined. Furthermore, the amino acid sequences 18 and 21 of RPS30, which were not analyzed through Edman degradation, are assumed to be 'K', and are indicated in red.

		Ident. (%)	M.W (Da)
<i>P. vittata</i>	KVHGSLARAGKVGCTPKVIDRQEKKKCKTGRAKRRMCYNRRFVNVPVTFGRRRGPNNSNS	In this study	6735.76
<i>S. clava</i>	KVHGSLARAGKVGCTPKVIDRQEKKKCKTGRAKRRMCYNRRFVNVPVTFGRRRGPNNSNS	98.31	6763.78
<i>P. mammillata</i>	KVHGSLARAGKVGCTPKVIDRQEKKKCKTGRAMRRMCYNRRFVNVPVTFGRRRGPNNSNS	91.53	6740.77
<i>C. intestinalis</i>	KVHGSLARAGKVGCTPKVIDRQEKKKCKTGRAKRRMCYNRRFVNVPVTFGRRRGPNNSNS	89.83	6678.71
<i>O. dioica</i>	KVHGSLARAGKVGCTPKVIDRQEKKKCKTGRAKRRMCYNRRFVNVPVTFGRRRGPNNSNS	89.83	6551.56

Figure 42. Alignment and molecular weight of full amino acid sequences of PvAMP4's isomer with other sea squirts. NCBI blast search was performed using the analyzed amino acid sequence for homology confirmation. It was confirmed that it was the same as the result confirmed by using the partial sequence previously, and the degree of identity with other sea squirts is as follows ; 93.31 % with *Styela clava*, 91.53 % with *Phallusia mammillata*, 89.83 % with *Ciona intestinalis* and 89.83 % *Oikopleura dioica*. The molecular weights are 6735.76, 6763.78 , 6740.77, 6678.71 and 6551.56 Da, respectively.

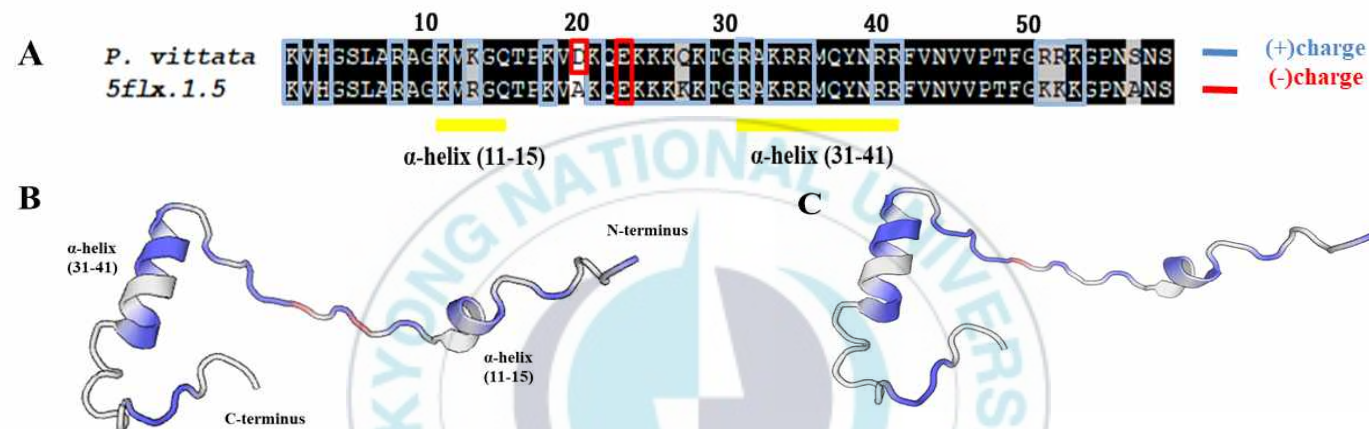


Figure 43. 3D modeling of PvAMP4's isomer compared to European rabbit's 40S RPS30. (A) Alignment data of PvAMP4's isomer purified from *Pyura vittata* with the European rabbit's 40S RPS30 (PDB accession no. 5flx.1.5). The amino acid sequence of 40S RPS30 showed 89.93% identity to that of European rabbit's 40S RPS30. (B) 3D model based on alignment data of European rabbit and PvAMP4's isomer amino acid sequence. Positive charges are indicated in blue, and negative charges are indicated in red. (C) 3D modeling of the European rabbit's 40S RPS30.

IV. 고찰

해양 생물은 물이라는 환경 특성상 다양한 박테리아와 바이러스 등과 같은 다양한 병원체에 밀접하고 지속적으로 노출되어 왔다. 따라서 병원체부터 스스로를 지키기 위해 육상 생물과는 다른 독특한 면역체계를 발전시킬 필요성이 있을 것으로 생각한다. 이러한 면역 물질 중, 선천성 면역 물질에 해당하는 AMP에 대한 연구가 지속적으로 많은 관심을 받아오고 있다. 따라서 본 연구에서는 해양생물 중 하나인, 돌명게의 조직 추출물로부터 AMP를 정제하고 그 특징을 분석하였다. 이를 통해 연구가 거의 이루어 지지 않은 돌명게의 천연 항균 및 생리활성 물질로서 가능성을 확인하고, 추후 의약품 개발의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

기존 논문에서 몇몇 명게의 항산화 효과에 대한 보고가 있다. 따라서 돌명게의 추출물에도 항산화능이 있는지 확인하고자 하였다. 가장 낮은 농도인 75 $\mu\text{g/mL}$ 에서부터 가장 높은 농도인 375 $\mu\text{g/mL}$ 까지 농도 의존적인 경향을 보였다. 강상모와 류정아의 연구에 의하면 만두명게와 분홍명게 추출물에 폴리페놀이 풍부하며, 이 물질이 높은 항산화 효과에 영향을 미친 것 같다고 보고하였다 [36]. 이러한 연구 결과를 참고했을 때, 돌명게 추출물의 항산화 효과도 폴리페놀을 포함한 여러 생리활성 펩타이드에 의해 농도 의존적인 결과가 나타났다고 생각한다.

항균활성측정을 위해 추출물을 분획화하였고, *B.subtilis* KCTC 1021과 *E.coli* D31에 대한 clear zone size를 측정하였다. RM10에서는 항균 활성이 거의 확인되지 않았으며, *E.coli* D31에서는 RM100의 항균활성이 크게 나타났다. 하지만 이후 농도 측정 결과에

의해, RM100의 항균활성 측정을 위해 loading된 물질량이 다른 물질에 비해 상대적으로 많은 것으로 분석되었다.

따라서 동일한 물질 양에 대한 clear zone의 크기를 비교하기 위해, 각 분획을 protein 15 μ g으로 계산하여 12종의 균과 1종의 곰팡이에 대한 항균활성을 측정하였다. Table 1에 나타난 것처럼 RM10, RM60 및 RM100의 항균활성을 비교하였을 때, RM60이 10종의 균과 곰팡이에 대해 상대적으로 높은 항균활성을 나타냈다. 따라서 RM60은 광범위한 항균 활성 스펙트럼을 가지고 있음을 확인하였다.

추출한 물질이 단백질성 물질인지 확인해보기 위해, trypsin 처리를 하였다. *B. subtilis* KCTC1021, *E. coli* D31 and *Candida albicans* KCTC 7965에 대해 변화를 확인하였다. Table 6에 나타냈듯이 RM10에서는 전체적으로 항균활성이 감소하는 경향을 보였다. 반면 RM60과 RM100의 경우 *E. coli* D31에 대해서 항균활성이 줄고, *B. subtilis* KCTC1021와 *Candida albicans* KCTC 7965에 대해서는 커지는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 예측해 봤을 때, RM60과 RM100의 추출액에 녹아 있던 소수성이 큰 단백질이, trypsin처리에 의해 항균활성이 있는 작은 펩타이드 단편들로 절단이 되면서 항균활성이 커졌을 가능성이 있을 것으로 추측된다. 따라서 이러한 변화를 생각해 봤을 때 RM60과 RM100에는 단백질성 물질이 있음을 예측할 수 있다.

세 분획 중 가장 항균활성이 좋다고 생각한 RM60을 HPLC를 사용해 항균활성 물질을 정제하였다. 여러 단계를 거쳐 총 8개의 AMP를 정제하고 분자량을 확인하였다. 정제한 물질은 각각 PvAMP1에서 PvAMP8까지 이름을 붙였다. 분자량 확인 후, edman degradation

방법을 통해 아미노산 서열분석을 수행하였다.

PvAMP1~3의 경우, 아미노산 서열이 분석되지 않았다. 일반적으로 acetylation, formylation 등에 의해, N-말단이 blocking되어 있으면 edman degradation에 의해 서열분석이 어렵다. 예를 들면 thymosin과 같은 물질은 N-말단이 acetylation되어있기 때문에, N-말단 분석이 불가능하다 [23]. 뿐만 아니라 Noga 등의 연구에 의하면, hydroxylated tryptophan처럼 비정상적인 아미노산이 존재하는 경우에도 edman degradation 방법으로 서열을 얻을 수 없었다는 보고가 있다 [36]. 따라서 N-bromo tryptophan과 같은 일반적이지 않은 아미노산 혹은 alkylation/acylation이 N-말단에 존재함으로 인해 서열이 분석되지 않았을 가능성이 있다고 생각한다.

PvAMP3은 부분적인 아미노산 서열 확인을 위해, 남은 물질 양으로 trypsin digestion을 진행하였다. 절단된 여러 fragment 중 2개의 peak에 대한 아미노산 서열을 확인하였다. 하지만 얻은 2개의 분획과 모두 homology를 가지는 물질은 확인하지 못했다. 이는 PvAMP3가 아직까지 밝혀지지 않은 단백질이거나 비교를 위해 사용한 서열정보가 부족했기 때문이라고 생각한다. 따라서 PvAMP3의 확인되지 않은 서열의 분석을 위해, 추가적인 protein digestion이 필요하다고 생각된다. Figure 32에 나타낸 결과를 보면, PvAMP3가 많은 펩타이드 단편으로 분해된 것이 확인된다. Trypsin은 lysine (K)과 arginine (R)의 C-terminus를 절단하는 효소이다. 따라서 PvAMP3의 서열 내에는 다수의 K나 R이 존재한다고 추측할 수 있다. 결과적으로 PvAMP3의 서열을 확인하기 위한 추가적인 실험에는 trypsin이 아닌

chymotrypsin이나 endopeptidase V8과 같은 다른 아미노산 서열을 절단하는 enzyme을 사용하는 것이 좋다고 생각한다. 혹은 cyanogen bromide나 formic acid를 처리해 chemical digestion 방법을 사용하여 실험을 진행할 예정이다.

Figure 36에 나타냈듯이 PvAMP4는 NCBI blast search 결과, 멧게 종 내에서는 ubiquitin like protein (UBL)과 높은 identity를 나타내었다. 이외에도 물고기의 'UBL and ribosomal protein S30 (RPS30)' 및 '40S RPS30'과 높은 identity를 나타내었다. UBL와 40S RPS30이 함께 암호화되는 뉴클레오타이드 서열을 'fau gene'이라고 부른다고 알려져 있다. 결과적으로 PvAMP4는 이 fau gene이 암호화하는 단백질의 생성물일 것으로 추측할 수 있었다. cDNA cloning 결과, N-말단에 UBL 서열이, C-말단에는 40S RPS30 서열이 있는 것을 확인하였다. 이후 cDNA cloning을 통해 확인한 아미노산 서열의 분자량을 계산해 본 결과, edman degradation을 통해 분석한 1번부터 23까지의 아미노산 서열은 모두 일치하였다. 하지만 cloning을 통해 확인한 전체 아미노산 서열의 분자량은, 정제한 물질의 분자량과 16 Da정도 차이가 있는 것으로 확인하였다. 아미노산 서열과 분자량의 유사도로 판단해 보았을 때, cloning을 통해 확인한 아미노산 서열은 본 실험에서 정제한 PvAMP4와 분자량이 차이가 있는 isomer의 아미노산 서열이 분석된 것으로 추측해 볼 수 있다. Isomer의 서열이 분석된 이유로는 정제를 위해 사용한 멧게와 cloning을 위해 사용한 멧게의 채집시기가 달랐기 때문일 가능성이 있다고 생각된다. 따라서 채집된 시기의 차이에 의해 특정 유전자의 발현량이 달라졌고, 정제된 물질과

cloning된 물질의 아미노산 서열이 일부 다른 것일 수도 있다고 추측하였다. 분석한 PvAMP4 isomer의 아미노산 서열을 다른 멧게의 RPS30으로 예측되는 아미노산 서열과 비교하였으며, 약 90~100%의 identity를 나타내었다. Figure 43에 나타낸 PvAMP4 isomer의 3D model을 참고해 생각해봤을 때, PvAMP4는 양전하 아미노산이 상대적으로 많으며 α -helix 구조를 취하는 31~41번 아미노산에 의해 항균활성이 나타났을 것으로 예측한다. Ying Luo와 Yuzhu Song의 보고에 의하면 이와 같은 구조를 띠는 단백질은 균의 막과 상호작용하여 파괴하거나 투과하기가 쉽기 때문에 항균활성을 나타낼 수 있다고 한다.

멧게는 형태학상 여러 해로운 균이 입을 통해 바로 생체 내로 들어오는 구조이다. 따라서 균에 저항하기 위해 아가미를 포함한 생체내에 여러 항균성 물질이 있을 것으로 추측할 수 있으며, PvAMP4 또한 생체 방어 역할을 하는 물질일 것으로 예측한다. 결과적으로 cDNA cloning을 통해 돌멧게에서 처음으로 항균활성이 있는 RPS30과 fau gene 서열을 확인하였다. Fau gene은 사람의 여러 암 중에서 유방암, 전립선암 및 난소암에서 하향 조절된다고 보고되어져 있다. 특히 유방암의 악화와 fau gene의 조절장애는 관련이 있다고 알려져 있다 [22]. 멧게는 해양생물 중, 척삭 동물에 속하며, 면역학 연구에 많이 사용되는 생물이다. 이러한 멧게의 특징은 사람의 암에 대해 연구하기에 상대적으로 윤리적인 문제가 적고, 더 간단한 연구 모델로서 사용될 수 있는 가능성을 제시한다. 이후 실험으로는 정제한 PvAMP4와 분자량이 일치하는 서열을 cloning을 통해 확인할 예정이다. 또한 돌멧게의 어떤 조직에서 가장 많은 발현량을 보이는지 분석하기 위해 RT-qPCR도 진행할 필요성도 있다고 생각한다.

서열이 분석된 isomer는 재조합 단백질을 만들어 물질을 대량 확보한 뒤, MEC 측정하고 NPN과 ONPG test를 통해 세포막과 반응하는 방법에 대해서도 추후 연구할 예정이다.

PvAMP5는 NCBI blast 분석 결과, *S. purpuratus*의 retinol binding protein (RBP)과 *L. variegatus*의 fatty acid binding protein (FABP)에서 100%의 identity를 나타냈다. Identity가 높게 측정된 서열의 분자량과 PvAMP5의 분자량을 비교해본 결과, 동일한 분자량을 가지는 것을 확인하였다. 하지만 figure 75에 나타냈듯이, RBP와 FABP를 통해 예측한 아미노산 서열의 N-말단 앞에는 cleavage site인 K나 R이 없고, 서열 내에 basic한 아미노산이 적다. 이러한 점들을 생각했을 때, 예측된 서열과는 다른 서열을 가질 가능성도 있을 것으로 생각한다. 따라서 cDNA cloning을 진행해, 정확한 아미노산 서열을 분석할 필요성이 있다.

PvAMP6~8은 성계의 sperm activating peptide (SAP)와 일치하거나 높은 identity를 나타내었다. 하지만 PvAMP6~8의 항균활성을 확인하기 위해 분석된 서열을 합성한 결과, 합성물의 항균활성은 확인할 수 없었다. 활성에 차이가 생긴 이유를 추측해 본 결과, 첫째로 합성물의 구조가 native 물질과 구조적으로 달라졌을 가능성이 있다. 둘째로 기존에 활성을 확인한 peak에 아주 작은 농도의 항균활성 성분이 혼합되어 있었을 가능성이 있다. 두 번째 가능성의 경우, 미량 성분으로 인해 활성만 존재하고 일차 서열은 분석이 되지 않았을 가능성이 있을 것으로 생각한다. 하지만 이전 연구 중, 멍게에서 SAP를 정제한 경우는 없었다. SAP는 일반적으로 해양 무척추 동물의 수정에

중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 이번 연구는 최초로 척삭 동물인 멍게에서 SAP를 정제했다는 점에서 의의를 둘 수 있다. 추후 실험으로는 확인된 SAP가 성게나 불가사리에도 효과가 있는지 연구할 예정이다.

요약하자면 이번 연구에서는 돌멍게 (*Pyura vittata*)의 조직 추출물을 사용해 총 8개 물질 (PvAMP1~8)을 정제하고 분자량을 분석하였다. 그 중 PvAMP3과 PvAMP6은 부분적인 서열을 확보하였고, PvAMP4는 cDNA cloning을 통해 isomer의 전체서열을 확인하였다. PvAMP4의 isomer는 ribosomal protein S30과 높은 identity를 나타내었다. 이 isomer는 N-말단에 ubiquitin-like protein 서열이 있는 fau gene으로 암호화되는 protein을 precursor로 가지는 것으로 확인하였다. 또한 PvAMP6~8은 sperm activating peptide로 분석하였다. Table 8에 전체적인 실험 결과와 추가 실험을 정리해서 나타내었다. 본 연구의 결과는 돌멍게로부터 생체방어에 기여하는 AMP에 대한 생물학적인 정보를 제공하며, 제약 산업에 사용할 수 있는 항생제 제작과 같은 면역학적인 측면에서 유용한 연구결과가 될 것이라고 생각한다.

Table 8. Result and further works of PvAMP1~8 from *Pyura vittata*.

Sample	M.W (Da)	Amino acid sequence	Homology	Further work
PvAMP1	7504.8665	-		Enzyme/Chemical digestion
PvAMP2	4166.0555	-		
PvAMP3	7990.9937	F1:1117.5045 F2:1199.5717 SAGGGYGVGAAGGH SVFDYTPSGAR	-	
PvAMP4	6751.8529	KVHGSLARAGKVKGQ TP...SNS	ribosomal protein	Recombinant protein/ RT-qPCR
PvAMP5	1652.8301	NWEGQAGKRFXN (M.W : 1306.39)	-	
PvAMP6	791.4060	GFALGGGGVG		cDNA Cloning
PvAMP7	807.4009	GFSLGGGGVG	sperm activating peptide	
PvAMP8	879.4214	GFDLTGGGVG		

V. 참고 문헌

1. Li Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein expression and purification*, 80(2), 260 - 267.
2. Jia, F., Wang, J., Zhang, L., Zhou, J., He, Y., Lu, Y., Liu, K., Yan, W., & Wang, K. (2021). Multiple action mechanism and in vivo antimicrobial efficacy of antimicrobial peptide Jelleine-I. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 27(3), e3294.
3. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72 - 80.
4. Zasloff M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), 5449 - 5453.
5. Lehrer, R. I., & Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in

mammalian and insect host defence. *Current opinion in immunology*, 11(1), 23 - 27.

6. Lazzaro, B. P., Zasloff, M., & Rolff, J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science* (New York, N.Y.), 368(6490), eaau5480.

7. Lazzaro, B. P., Zasloff, M., & Rolff, J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science* (New York, N.Y.), 368(6490), eaau5480.

8. Hancock, R. E., & Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*, 8(9), 402 - 410.

9. C. Uribe, H. Folch, R. Enríquez, G. Moran, (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina*, 56(10), 486-503.

10. Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., & Kisich, K. O. (2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Current pharmaceutical design*, 15(21), 2377 - 2392.

11. Méndez-Samperio P. (2013). Recent advances in the field of antimicrobial peptides in inflammatory diseases. *Advanced biomedical research*, 2, 50.
12. Savini, F., Loffredo, M. R., Troiano, C., Bobone, S., Malanovic, N., Eichmann, T. O., Caprio, L., Canale, V. C., Park, Y., Mangoni, M. L., & Stella, L. (2020). Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: Interaction with different species, strains and cellular components. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1862(8), 183291.
13. Brown, K. L., & Hancock, R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current opinion in immunology*, 18(1), 24 - 30.
14. Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(12), 1543 - 1575.
15. Buda De Cesare, G., Cristy, S. A., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2020). Antimicrobial Peptides: a New Frontier in Antifungal Therapy. *mBio*, 11(6), e02123-20.
16. Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial

Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11401.

17. Kobayashi, S., Takeshima, K., Park, C. B., Kim, S. C., & Matsuzaki, K. (2000). Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor. *Biochemistry*, 39(29), 8648 - 8654.

18. Subbalakshmi, C., & Sitaram, N. (1998). Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS microbiology letters*, 160(1), 91 - 96.

19. Maria-Neto, S., Cândido, E.deS., Rodrigues, D. R., de Sousa, D. A., da Silva, E. M., de Moraes, L. M., Otero-Gonzalez, A.deJ., Magalhães, B. S., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2012). Deciphering the magainin resistance process of *Escherichia coli* strains in light of the cytosolic proteome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 1714 - 1724.

20. Braffman, N. R., Piscotta, F. J., Hauver, J., Campbell, E. A., Link, A. J., & Darst, S. A. (2019). Structural mechanism

of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistruin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(4), 1273 - 1278.

21. Bulet, P., Stöcklin, R., & Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological reviews, 198, 169 - 184.

22. Perina, D., Korolija, M., Hadžija, M. P., Grbeša, I., Belužić, R., Imešek, M., Morrow, C., Marjanović, M. P., Bakran-Petricioli, T., Mikoč, A., & Četković, H. (2015). Functional and Structural Characterization of FAU Gene/Protein from Marine Sponge *Suberites domuncula*. Marine drugs, 13(7), 4179 - 4196.

23. Seo, J. K., Lee, M. J., Go, H. J., Kim, G. D., Jeong, H. D., Nam, B. H., & Park, N. G. (2013). Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Molecular immunology, 53(1-2), 88 - 98.

24. Lee, J.-E., & Kang, S.-M. (2021). The Antioxidation Effect of Ethanol Extracts from *Ciona intestinalis* and *Ciona*

savignyi. Journal of Convergence for Information Technology, 11(4), 186 - 193.

26. Park, S.-H., & Yang, J.-C. (2018). Studies on the Stability of Natural Pigment Extracted from Ascidian shell. Journal of Oil & Applied Science, 35(1), 292 - 298.

27. Dash, R., & Bhattacharjya, S. (2021). Thanatin: An Emerging Host Defense Antimicrobial Peptide with Multiple Modes of Action. International journal of molecular sciences, 22(4), 1522.

28. Subbalakshmi, C., & Sitaram, N. (1998). Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. FEMS microbiology letters, 160(1), 91 - 96.

29. Relf, J. M., Chisholm, J. R., Kemp, G. D., & Smith, V. J. (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. European journal of biochemistry, 264(2), 350 - 357.

30. Lee, I. H., Lee, Y. S., Kim, C. H., Kim, C. R., Hong, T.,

Menzel, L., Boo, L. M., Pohl, J., Sherman, M. A., Waring, A., & Lehrer, R. I. (2001). Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *Biochimica et biophysica acta*, 1527(3), 141 - 148.

31. Jang, W. S., Kim, K. N., Lee, Y. S., Nam, M. H., & Lee, I. H. (2002). Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS letters*, 521(1-3), 81 - 86.

32. Azumi, K., Yokosawa, H., & Ishii, S. (1990). Halocyamines: novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry*, 29(1), 159 - 165.

33. Lehrer, R. I., Lee, I. H., Menzel, L., Waring, A., & Zhao, C. (2001). Clavanins and styelins, alpha-helical antimicrobial peptides from the hemocytes of *Styela clava*. *Advances in experimental medicine and biology*, 484, 71 - 76.

34. Lee, I. H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S. S., Cooper, E. L., & Lehrer, R. I. (1997). Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS letters*,

400(2), 158 - 162.

35. Galinier, R., Roger, E., Sautiere, P. E., Aumelas, A., Banaigs, B., & Mitta, G. (2009). Halocyntin and papillosin, two new antimicrobial peptides isolated from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia papillosa*. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 15(1), 48 - 55.

36. Noga, E. J., Silphaduang, U., Park, N. G., Seo, J. K., Stephenson, J., & Kozlowicz, S. (2009). Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 152(4), 299 - 305.

37. Rho Boon Jo. (1971). A Study on the Classification and the Distribution of the Korean Ascidians. *Journal of Korean Research Institute for Better Living*. 6, 103-166.

38. Tincu, J. A., Menzel, L. P., Azimov, R., Sands, J., Hong, T., Waring, A. J., Taylor, S. W., & Lehrer, R. I. (2003). Plicatamide, an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocytes. *The Journal of biological chemistry*, 278(15),

13546 - 13553.

39. Tincu, J. A., Menzel, L. P., Azimov, R., Sands, J., Hong, T., Waring, A. J., Taylor, S. W., & Lehrer, R. I. (2003). Plicatamide, an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocytes. *The Journal of biological chemistry*, 278(15), 13546 - 13553.

40. Chen, Y., Yao, L., Wang, Y., Ji, X., Gao, Z., Zhang, S., & Ji, G. (2021). Identification of ribosomal protein L30 as an uncharacterized antimicrobial protein. *Developmental and comparative immunology*, 120, 104067.

41. Qu, B., Ma, Z., Yao, L., Gao, Z., & Zhang, S. (2020). Preserved antibacterial activity of ribosomal protein S15 during evolution. *Molecular immunology*, 127, 57 - 66.

42. Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2020). Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein and peptide letters*, 27(1), 4 - 16.

43. Fernandes, J. M., & Smith, V. J. (2002). A novel antimicrobial function for a ribosomal peptide from rainbow

trout skin. Biochemical and biophysical research communications, 296(1), 167 - 171.

44. de Carvalho, K. G., Bambirra, F. H., Kruger, M. F., Barbosa, M. S., Oliveira, J. S., Santos, A. M., Nicoli, J. R., Bemquerer, M. P., de Miranda, A., Salvucci, E. J., Sesma, F. J., & Franco, B. D. (2010). Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(4), 381 - 390.

45. Pidutti, P., Federici, F., Brandi, J., Manna, L., Rizzi, E., Marini, U., & Cecconi, D. (2018). Purification and characterization of ribosomal proteins L27 and L30 having antimicrobial activity produced by the *Lactobacillus salivarius* SGL 03. *Journal of applied microbiology*, 124(2), 398 - 407.

46. Ghoreishi, F. S., Roghanian, R., & Emtiazi, G. (2022). Simultaneous Production of Antibacterial Protein and Lipopeptides in *Bacillus tequilensis*, Detected by MALDI-TOF and GC Mass Analyses. *Probiotics and antimicrobial proteins*.

47. Oh, H. Y., Go, H. J., & Park, N. G. (2020). Identification

and characterization of SaRpAMP, a 60S ribosomal protein L27-derived antimicrobial peptide from amur catfish, *Silurus asotus*. *Fish & shellfish immunology*, 106, 480 - 490.

48. Seo, J. K., Kim, D. G., Oh, R., Park, K. S., Lee, I. A., Cho, S. M., Lee, K. Y., & Nam, B. H. (2017). Antimicrobial effect of the 60S ribosomal protein L29 (cgRPL29), purified from the gill of pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, 67, 675 - 683.

49. Butler, È., Alsterfjord, M., Olofsson, T. C., Karlsson, C., Malmström, J., & Vásquez, A. (2013). Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC microbiology*, 13, 235.

50. García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(13), 5243 - 5257.

51. Ovchinnikova, T. V., Aleshina, G. M., Balandin, S. V.,

Krasnodembskaya, A. D., Markelov, M. L., Frolova, E. I., Leonova, Y. F., Tagaev, A. A., Krasnodembsky, E. G., & Kokryakov, V. N. (2004). Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. FEBS letters, 577(1-2), 209 - 214.

52. Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., & Shimonishi, Y. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. The Journal of biological chemistry, 263(32), 16709 - 16713.

53. Ovchinnikova, T. V., Balandin, S. V., Aleshina, G. M., Tagaev, A. A., Leonova, Y. F., Krasnodembsky, E. D., Men'shenin, A. V., & Kokryakov, V. N. (2006). Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. Biochemical and biophysical research communications, 348(2), 514 - 523.

54. Wang, Y., Zeng, Z., Zhang, X., Shi, Q., Wang, C., Hu, Z.,

& Li, H. (2018). Identification and characterization of a novel defensin from Asian green mussel *Perna viridis*. *Fish & shellfish immunology*, 74, 242 - 249.

55. Tasiemski, A., Schikorski, D., Le Marrec-Croq, F., Pontoire-Van Camp, C., Boidin-Wichlacz, C., & Sautière, P. E. (2007). Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. *Developmental and comparative immunology*, 31(8), 749 - 762.

56. Park, I. Y., Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1998). Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS letters*, 437(3), 258 - 262.

57. Cole, A. M., Weis, P., & Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *The Journal of biological chemistry*, 272(18), 12008 - 12013.

58. Iijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Murakami, T., & Nakai, T. (2003). Purification and

characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. European journal of biochemistry, 270(4), 675 - 686.

59. Subramanian, S., Ross, N. W., & MacKinnon, S. L. (2009). Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. Marine biotechnology (New York, N.Y.), 11(6), 748 - 757.

60. Peng, K. C., Lee, S. H., Hour, A. L., Pan, C. Y., Lee, L. H., & Chen, J. Y. (2012). Five different piscidins from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions. PloS one, 7(11), e50263.

61. Shike, H., Lauth, X., Westerman, M. E., Ostland, V. E., Carlberg, J. M., Van Olst, J. C., Shimizu, C., Bulet, P., & Burns, J. C. (2002). Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. European journal of biochemistry, 269(8), 2232 - 2237.

62. 김봉석, 방종득, 류호영, 홍정표 & 정의영. (2001). 우렁쟁이, *Halocynthia roretzi*의 배우자 형성 및 생식소 발달. Development

and reproduction, 5(2). 137-144

63. 박큰바위, 류아라, 김송희, 함인태, 권지영, 김지희, 유홍식, 이희정, 목종수. (2017). 굴(*Crassostrea gigas*), 멍게(*Halocynthia roretzi*) 및 해삼(*Apostichopus japonicus*)에서 분리한 대장균의 항균제 내성 특성. 한국수산과학회지, 50(5), 494-499

64. 강상모, & 류정아. (2021). 만두멍게와 분홍멍게 에탄올 추출물의 항산화 효과. 융합정보논문지. 11(5), 215-222.



돌멍게(*Pyura vittata*)로부터 항균성 펩타이드의 정제 및 특성

박원정

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 수 산 생 명 과 학 부 생 물 공 학 전 공

요 약

본 논문은 돌멍게(*Pyura vittata*)의 껍질을 제외한 전체 조직을 사용해 항균 및 항산화 활성을 확인하였고, 그 특성에 관한 분석 내용을 기술하고 있다. 항균활성 측정 결과, 추출물은 그람 양성균, 그람 음성균, 곰팡이 균 및 어병세균에 대해 광범위한 항균 활성을 나타냈다. 이후 돌멍게 추출물을 사용해 정제 단계를 진행했으며, 각 분획에 대한 항균활성은 *B. subtilis* KCTC 1022를 사용하여 확인하였다. 정제된 항균 활성 펩타이드 (AMP)는 돌멍게(*Pyura vittata*)에서 분리된 AMP라는 의미로 PvAMP라고 명명하였으며, 총 8개의 항균활성 펩타이드(PvAMP1~8)를 정제하였다. PvAMP1~3은 분자량을 확인하였으며, 아미노산 서열 분석이 추가적으로 필요하다. 다음으로 PvAMP4는 분자량 확인 후, N-말단부터 23번째 아미노산 서열까지 분석하였다. 분석한 아미노산 서열은 40S ribosomal protein S30 (RPS30)과 높은 identity를 나타내었다. 이후 cDNA cloning 결과, PvAMP4의 isomer로 예측되는 물질의 전체 서열을 확인하였으며, ubiquitin-like protein과 ribosomal protein S30이 연속적으로 나타나는 protein을 precursor로 가지고 있음을 확인하였다. PvAMP5 또한 분자량 확인 후, N-말단부터 12번까지 아미노산 서열을 분석하였다. 분석한 서열은 성게의 retinol binding protein (RBP)의 일부와 서열이 일치하는 것을 확인하였다. 이외에도 PvAMP6~8의 분자량 및 아미노산 서열을 분석하였으며, 분석한 서열은 성게의 sperm activating peptide (SAP)와 높은 identity를 가지는 것을 확인하였다. 이번 연구에서 최초로 돌멍게의 AMP를 8개 정제하였으며, 또한 그 특성을 분석하였다.

감사의 말

학부생이었을 때를 포함해서 약 3년간의 실험실 생활이 이렇게 마무리가 되네요. 많이 부족한 제가 이렇게 무사히 석사과정을 마치고 졸업을 할 수 있었던 것은 많은 분들의 도움이 있었기 때문이라고 생각합니다.

가장 먼저 BMS라는 실험실을 선택하게 된 계기를 만들어 주신 저의 지도 교수님인 박남규 교수님께 진심으로 감사드립니다. 교수님의 수업을 시작으로 실험에 흥미를 붙일 수 있었고, 덕분에 석사 과정에 진학을 해 무사히 마무리 할 수 있었습니다. 항상 관심을 가지고 아낌없이 지도해주신 박남규 교수님! 교수님 밑에서 배울 수 있어서 정말 영광이었습니다. 앞으로 언제 어디서든 교수님의 자랑스러운 제자가 될 수 있도록 항상 노력하겠습니다.

실험을 위한 기초 지식을 알려주신 생물공학과의 여러 교수님들께도 감사 인사를 드립니다. 특히 이번 석사과정 졸업에 큰 도움을 주신 이형호 교수님과 한상준 교수님께 더욱 감사드립니다.

다음으로 BMS 실험실 식구들!

먼저 석사과정 동안 꾸준히 저를 지도해주신 고혜진 박사님. 많이 혼나기도 했지만, 박사님 덕분에 정신 차리고 실험을 해나갈 수 있었던 것 같습니다. 실수 투성이었던 저를 졸업까지 잘 이끌어 와 주셔서, 정말 감사드립니다. 회사 생활하면서 박사님께 배웠던 것들을 잘 활용해보겠습니다. 아프지 마시고 건강하세요!

조미정 박사님. 애기 때문에 오래 보지는 못했지만, 박사님과 실험실에 있으면 실험실에 에너지가 넘쳐서 좋았어요! 동생같이 잘 챙겨주셔서 정말

감사드립니다. 졸업식 때 뵈 수 있다면 정말 좋을 것 같아요!

혜영이 언니! 제가 정말 간단한 질문을 해도 열심히 설명해주시고, 실험실에 있으면서 사소한 것부터 신경써주시고 챙겨주셔서 감사드려요. 언니랑 함께 먹었던 저녁 시간도 자주 생각날 것 같아요. 또 밥 같이 먹어요!

제가 언니라고 부르는게 어색한 아나스타샤 언니! 바쁘게 실험하고 있으면, 조용히 옆에서 도와줘서 많이 고마웠어요. PCR 조건 잡을 때도 함께 고민해줘서 실험 결과가 잘 나올 수 있었던 것 같아요. 아나도 좋은데 취업하고, 밥 잘 챙겨먹어야 해요 아나!

박사 학위 따신다고 고생하신 은희 선배님. 매일 야근하시면서 논문을 쓰시던 모습이 어제 같은데, 벌써 저도 이렇게 논문을 마무리하게 되었네요. 졸업하고 나서 다시 돌아와 학위를 따신 모습을 보고, 진심으로 존경스럽다고 생각했습니다. 항상 건강하시고 부산 내려오면 연락드릴게요!

석사 동기 수현이 오빠. 고민이 있을 때마다 잘 들어주고, 함께 고민해줘서 고마워. 덕분에 중간에 포기하지 않고 졸업까지 온 것 같아. 이제 본격적으로 박사 과정 시작할텐데, 걱정하지 말고 하고 싶은 연구 많이 하고 졸업하길 바래. 석사과정보다 두꺼운 논문 기대할게!

3년 동안 만난 여러 학부 선.후배님들. 여러분들 덕분에 실험실 생활을 활기차고 재미있게 보낼 수 있었던 것 같아요! 또 만나는 그때까지 서로 행복하고 건강하게 지냈으면 좋겠습니다. 감사해요!

그리고 명계를 구해주신 민락 어촌계 해녀분들께도 감사인사를 드립니다.

마지막으로 지금까지 제가 학업을 이어나 갈 수 있게, 꾸준히 뒤에서 지켜봐주시고 도와주신 우리 가족들 진심으로 감사드려요. 앞으로는 제가 효도하면서 살도록 하겠습니다. 사랑해요!

지금까지 만난 모든 인연들 덕분에 무사히 졸업할 수 있었습니다.

그 모든 분들에게 제 석사 논문을 바칩니다.

